

(12)

**DEMANDE DE BREVET EUROPEEN**

(21) Numéro de dépôt: 86402085.4

(51) Int. Cl.<sup>4</sup>: **A 61 K 37/02**

(22) Date de dépôt: 23.09.86

**C 12 P 21/00, C 07 K 3/12**

(30) Priorité: 23.09.85 FR 8514083

(43) Date de publication de la demande:  
22.04.87 Bulletin 87/17

(84) Etats contractants désignés:  
AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

(71) Demandeur: **UNIVERSITE DE TECHNOLOGIE DE COMPIEGNE**  
Centre Benjamin Franklin Rue Roger Couttolenc - BP 233  
F-60206 Compiègne Cédex(FR)

(72) Inventeur: **El Akoum, Ali**  
1, Square Philibert Delorme Appt. 814  
F-60200 Compiègne(FR)

(72) Inventeur: **Guespin-Michel, Janine**  
7, rue du Mal Douglas Haig  
F-60200 Compiègne(FR)

(72) Inventeur: **Sigot, Michel**  
11, avenue de la Division Leclerc  
F-60200 Compiègne(FR)

(74) Mandataire: **Peaucelle, Chantal et al.**  
**S.C. Ernest Gutmann - Yves Plasseraud 67, boulevard**  
**Hausmann**  
F-75008 Paris(FR)

(54) Glycopeptides et glycoprotéines, toute composition les contenant leur procédé de préparation et leurs applications anticoagulantes.

(57) L'invention a pour objet des glycopeptides et des glycoprotéines caractérisés par les propriétés suivantes:  
leur poids moléculaire est compris d'environ 5000 à environ 20 000 daltons;

les résidus sucres contenus sont des hexoses et des hexoses aminés;

ils sont anticoagulants sur sang total à partir d'une concentration d'environ 80 µg/ml;

ils entraînent un allongement du temps de céphaline-kaolin, du temps de thrombine;

ils entraînent un allongement du temps de Quick;

ils inactivent le facteur Xa.

Ces glycopeptides présentent des propriétés biologiques leur permettant notamment de jouer un rôle régulateur vis-à-vis de la coagulation sanguine.

GLYCOPEPTIDES ET GLYCOPROTEINES. TOUTE COMPOSITION LES  
CONTENANT LEUR PROCEDE DE PREPARATION  
ET LEURS APPLICATIONS ANTICOAGULANTES

5

L'invention est relative à des molécules glycopeptidiques et glycoprotéiniques présentant des propriétés biologiques leur permettant notamment de jouer un rôle régulateur vis-à-vis de la coagulation sanguine.

10 L'invention vise également toute composition contenant ces molécules glycopeptidiques et glycoprotéiniques, ainsi que toute composition contenant ces molécules glycopeptidiques et glycoprotéiniques et possédant des propriétés biologiques leur permettant de  
15 jouer un rôle vis-à-vis de la coagulation sanguine.

De telles molécules glycopeptidiques et glycoprotéiniques peuvent être obtenues notamment à partir des myxobactéries qui produisent un mucus qui absorbe le rouge congo.

20 On sait que l'héparine est sans doute à ce jour l'un des médicaments le plus largement utilisé dans l'application anticoagulante. Elle est en effet capable d'intervenir à plusieurs niveaux dans les cascades de réactions enzymatiques successives, qui sont normalement  
25 mises en jeu au cours de l'hémostase physiologique, dans toute situation susceptible d'entraîner une hypercoagulabilité du sang. Elle est plus particulièrement capable de déprimer simultanément un grand nombre des facteurs de la coagulation intervenant dans la création et le  
30 maintien des différentes formes d'hypercoagulabilité.

C'est évidemment pour pallier les effets d'hypercoagulabilité que l'on a couramment recours aux puissantes propriétés anticoagulantes de l'héparine, en  
vue de ramener le mécanisme coagulation-fibrinolyse à  
35 l'équilibre, chaque fois que celui-ci subit une

perturbation importante, par exemple à l'occasion d'une intervention chirurgicale sur l'hôte. Il est cependant bien connu que ces tentatives de rééquilibrage sont extrêmement délicates et que, en conséquence, l'adminis-  
5 tration de doses trop élevées de médicament anticoagulant -ou l'insuffisante sélectivité de celui-ci- dans le but de prévenir les risques d'hypercoagulation, par exemple l'apparition de thromboses post-chirurgicales, peut finalement être à l'origine d'hémorragies graves :  
10 d'où la nécessité d'une surveillance constante des patients traités et des ajustements nécessaires des doses administrées -en continu ou en discontinu- en fonction des résultats de tests, notamment de coagulabilité globale, comme le temps de Howel, qui doivent être prati-  
15 qués à intervalles réguliers.

On rappellera ci-après, dans les limites de ce qui est nécessaire pour la clarté de l'exposé, quelques unes des notions de base, et volontairement simplifiées, relatives à la coagulation. Le processus de coagulation  
20 comprend en effet trois phases généralement décrites comme successives, même si elles sont étroitement intriquées :

- la thromboplastinoformation, phase de formation de prothrombinase (ou thromboplastine active) ;
- 25 - la thrombinoformation, phase qui peut se résumer à la transformation de la prothrombine en thrombine sous l'influence de la prothrombinase en présence de calcium ionisé et enfin
- la fibrinoformation, phase au cours de laquelle le le fibrinogène sanguin est, sous l'effet de la throm-  
30 bine, transformé en fibrine, protéine qui tend à devenir insoluble.

La formation de prothrombinase se fait, au cours de l'étape de thromboplastinoformation, essentiellement  
35 selon deux voies différentes : la voie intrinsèque ou

endogène, et la voie extrinsèque ou exogène, lesquelles aboutissent à la formation de prothrombinases d'origines respectivement plasmatique et tissulaire, toutes deux susceptibles d'activer la prothrombine en thrombine active.

La voie (ou système) intrinsèque ou endogène fait intervenir un grand nombre de facteurs ou proenzymes plasmatiques susceptibles d'être successivement activés (facteurs XII, XI, IX, VIII et X), où chaque produit activé (facteurs XIIa, XIa, IXa, VIIIa et Xa) agit comme une enzyme capable d'activer la proenzyme suivante, le facteur X activé (Xa) intervenant alors, notamment par réaction avec le facteur V et un phospholipide d'origine plaquettaire, dans la production de prothrombinase plasmatique endogène active. Le système extrinsèque ou exogène, qui peut notamment se trouver sous la dépendance directe d'une lésion tissulaire, fait appel à un nombre plus limité de facteurs et comporte notamment la production de thromboplastine tissulaire qui, en combinaison avec le facteur VII, peut, tout comme le facteur VIIIa, transformer le facteur X inactif en facteur Xa. La séquence d'activation de la prothrombine en thrombine est ensuite sensiblement la même que pour le système intrinsèque, mais le phospholipide est ici d'origine tissulaire et non plasmatique.

On peut donc, à la limite, exprimer l'idée que les deux voies, intrinsèque et extrinsèque, se rejoignent au niveau de l'activation du facteur X (aussi appelé facteur Stuart), les deux phases suivantes de la coagulation -thrombinoformation et fibrinoformation- ne donnant alors plus lieu à une distinction entre voies intrinsèque et extrinsèque.

L'aboutissement du processus de coagulation consiste dans la formation d'un caillot de fibrine insoluble, destiné notamment à colmater la lésion à l'origine

du déclenchement de ce processus, par exemple au niveau d'un vaisseau sanguin.

Ces processus de coagulation font normalement place ensuite à un processus, dénommé fibrinolyse, destiné à produire la lyse du caillot, notamment sous l'effet de la plasmine, enzyme qui n'existe normalement dans le sang circulant que sous la forme d'un précurseur inactif, le plasminogène, la fibrine elle-même constituant néanmoins l'un des facteurs susceptibles de déclencher la transformation du plasminogène inactif en plasmine fibrinolytiquement active.

En fait, bien que l'on ait, dans ce qui précède, présenté les systèmes de coagulation et de fibrinolyse comme deux processus se produisant successivement dans le temps, il n'en est pas normalement toujours ainsi dans la réalité. En fait, il s'agit de mécanismes équilibrés, selon des processus extrêmement complexes, sous la dépendance de facteurs activateurs et inhibiteurs harmonieusement opposés. Le déséquilibre de ces mécanismes, dans le sens d'une hypercoagulabilité, est alors susceptible d'entraîner des thromboses. A l'opposé, un déséquilibre dans le sens d'une hypocoagulabilité, expose l'hôte à des risques hémorragiques.

En ce qui concerne les myxobactéries qui peuvent être utilisées pour la préparation des glycopeptides selon l'invention ou de toute composition les contenant, on rappellera ci-après les éléments suivants. L'ordre des myxobactérales (myxobactéries) est très homogène. Des études sur l'ordre des myxobactéries ainsi que sur la taxonomie des myxobactéries ont été effectuées par REICHENBACH H. et DWORKIN M., The Order Myxobacterales in the prokaryotes, a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria, 20, p. 328-355, D. McCURDY H., Canadian Journal of Microbiology, vol. 15, 1969, p. 1 453-1 461.

L'ordre des myxobactéries est constitué de bactéries à Gram négatif, unicellulaires, aérobies strictes, mobiles par glissement et capables de former des fructifications contenant des formes de résistance ou  
5 myxospores. Elles vivent au détriment de macromolécules en excréant de nombreux enzymes lytiques, ainsi que des antibiotiques et un mucus. Leur ADN présente une grande homogénéité de composition (66 à 72 % G + C).

Les critères taxonomiques permettant de différencier les deux sous-ordres, quatre familles et douze  
10 genres qui les composent sont la forme des bactéries, des fructifications et des myxospores, leur composition en acides gras et la nature de leur mucus.

On distingue deux sous-ordres d'après ce dernier  
15 critère : les Cystobacterinae et les Sorangiaceae. Les Cystobacterinae produisent un mucus qui absorbe le rouge Congo alors que le mucus produit par les Sorangiaceae ne l'absorbe pas. La famille des Myxococcaceae à laquelle appartient l'espèce très connue *Myxococcus xanthus* fait  
20 partie des Cystobacterinae (Studies on the taxonomy of the Myxobacterials I. Record of Canadian isolates and survey of methods, H. Mc CURDY).

L'homogénéité des propriétés des mucus excrétés par les différentes espèces de Cystobacterinae est aussi  
25 soulignée par les expériences de Burchard (BURCHARD R. P., 1982, Trails following by gliding bacteria, Journal of Bacteriology, p. 943-950) montrant que la trace muqueuse laissée par une espèce peut être semblable à celle de bactéries d'autres espèces ou genres voisins, de  
30 ce sous-ordre.

Compte tenu de l'homogénéité de la composition et des propriétés du mucus excrété par les espèces du sous-ordre des Cystobacterinae, les résultats concernant une souche appartenant au sous-ordre des Cystobacterinae  
35 peuvent être considérés, à ce jour, comme valables pour

toutes les espèces du sous-ordre des Cystobacterinae (Myxococcus, Corallococcus, Angiococcus, Archangium, Cystobacter, Melihangium, Stigmatela) ainsi que pour certains mutants de l'une de ces souches sauvages.

5 Les myxobactéries ont fait l'objet de nombreuses publications, notamment relativement à leur sécrétion abondante qui contient des antibiotiques, des protéines et un mucus polysaccharidique (cf. J. W. SUTHERLAND and S. THOMSON, Journal of General Microbiology, 1975, 89,  
10 124-132) comparisons of polysaccharides produced by Myxococcus strains).

Mais, compte tenu de la complexité de cette sécrétion, on n'a encore à ce jour jamais isolé d'extraits de cette sécrétion, même a fortiori mis en évidence de  
15 propriétés biologiques particulières.

Or, la Société Demanderasse a trouvé de façon inattendue en étudiant les sécrétions du milieu de culture de myxobactéries dont le mucus absorbe le rouge Congo, des molécules glycopeptidiques et glycoprotéi-  
20 niques possédant une activité biologique, notamment vis-à-vis de la coagulation sanguine.

L'invention a pour but de fournir des principes actifs de médicaments (et les médicaments eux-mêmes) qui permettent de remédier au moins en partie aux difficul-  
25 tés énoncées à propos de l'héparine, notamment qui soient capables de permettre un rééquilibrage éventuel et/ou un contrôle plus aisé, au prix d'une moindre surveillance clinique du système coagulation-fibrinolyse chez des patients affectés d'une pathologie de la coa-  
30 gulation ou ayant subi un traitement, tel qu'une intervention chirurgicale, qui les exposent à des risques d'hypercoagulabilité.

L'invention concerne plus particulièrement des glycopeptides et glycoprotéines, et toute composition  
35 les contenant, exerçant un effet régulateur à l'égard de

la coagulation, notamment dans le sens d'un retard à la coagulation, cependant par la mise en jeu d'actions inhibitrices différentes de celles de l'héparine, voire plus sélectives que celles de l'héparine.

5 L'invention a pour objet de fournir des glycopeptides et des glycoprotéines, ou toute composition les contenant, présentent une action anticoagulante caractérisée essentiellement par une inhibition directe de la thrombine, sans impact négatif sur la structure du  
10 fibrinogène et sa capacité de se polymériser.

L'invention a également pour objet de fournir des glycopeptides et des glycoprotéines ou toute composition les contenant, présentant des propriétés anticoagulantes et d'innocuité vis-à-vis des cellules  
15 endothéliales.

L'invention a donc pour objet de fournir un principe actif particulièrement intéressant vis-à-vis des propriétés anticoagulantes dont les propriétés sont stables et qui n'est pas toxique.

20 L'invention a également pour objet de fournir des principes actifs anticoagulants qui peuvent être obtenus à l'aide de produits extrêmement courants et peu onéreux.

L'invention a pour objet de fournir des glycopeptides et des glycoprotéines et toute composition les contenant présentant des propriétés anticoagulantes et qui peuvent être produits en masse, de façon simple et rentable à l'échelle industrielle.

L'invention a pour objet des glycopeptides caractérisés par les propriétés suivantes :

- 30
- leur poids moléculaire est compris d'environ 5 000 à environ 20 000 daltons, notamment d'environ 5 000 à environ 10 000 ;
  - les motifs contenus sont des hexoses et des  
35 hexoses aminés, appartenant au groupe constitué



par le mannose, le glucose, le galactose, la galactosamine, la glucosamine ;

- leur comportement en chromatographie HPLC n'est pas modifié par le sodium dodécylsulfate ;

5           - leur pH isoélectrique est d'environ 3 à environ 5, notamment environ 3,6 ;

- ils sont anticoagulants sur sang total à partir d'une concentration d'environ 80 µg/ml ;

10           - leur activité anticoagulante est d'environ 2 à environ 10 UI/mg ;

- ils entraînent un allongement du temps de céphaline-kaolin ;

- ils entraînent un allongement du temps de Quick ;

15           - ils entraînent un allongement du temps de thrombine ;

- ils inactivent le facteur Xa.

Plus particulièrement, les glycopeptides et les glycoprotéines selon l'invention ont la composition  
20 suivante :

- environ 70-80 % (en poids) de résidus d'acides aminés ;

- environ 30-20 % (en poids) de motifs sucres, lesquels motifs sucres sont constitués par environ 60 à  
25 environ 65 % (en poids) de sucres neutres et environ 35 à environ 40 % (en poids) d'osamine.

La composition des motifs de sucres neutres est constituée par environ 30 à 35 % (en poids) de glucose, environ 15 à environ 20 % (en poids) de mannose, environ  
30 10 à environ 15 % (en poids) de galactose.

La composition des osamines comprend d'environ 20 à environ 25 % (en poids) de glucosamine et d'environ 10 à environ 15 % (en poids) de galactosamine.

Selon un mode de réalisation avantageux, la composition en sucres des glycopeptides et glycoprotéines  
35

de l'invention est la suivante.

- environ 35 % (en poids) de glucose,
- environ 11,4 % (en poids) de galactose,
- environ 16,3 % (en poids) de mannose,
- 5 - environ 23,3 % (en poids) de glucosamine et
- environ 14 % (en poids) de galactosamine.

Selon un mode de réalisation avantageux, la composition des glycopeptides et glycoprotéines de l'invention, en acides aminés est la suivante

- 10 - environ 30 à environ 35 % (en poids) d'acide glutamique ;
- environ 25 à environ 30 % (en poids) de sérine ;
- environ 5 à environ 10 % (en poids) d'acide
- 15 aspartique ;
- environ 5 à environ 10 % (en poids) de glycine ;
- environ 5 à environ 10 % (en poids) d'isoleucine ;
- 20 - environ 5 à environ 10 % (en poids) d'alanine ;
- environ 0 à environ 5 % (en poids) de valine ;
- environ 0 à environ 5 % (en poids) de leucine ;
- 25 - environ 0 à environ 5 % (en poids) de thréonine ;
- environ 0 à environ 5 % (en poids) de tyrosine ;
- moins d'environ 2 % (en poids) de proline ;
- 30 - moins d'environ 2 % (en poids) de lysine ;
- moins d'environ 2 % (en poids) de phénylalanine ;
- moins d'environ 2 % (en poids) d'histidine ;
- moins d'environ 2 % (en poids) d'arginine.
- 35 Selon un autre mode de réalisation de

l'invention, la composition des glycopeptides et glycoprotéines de l'invention en acides aminés est la suivante

- environ 31 % (en poids) d'acide glutamique,
- 5 - environ 28 % (en poids) de sérine,
- environ 7 % (en poids) d'acide aspartique,
- environ 6 % (en poids) de glycine,
- environ 5,5 % (en poids) d'isoleucine,
- environ 5 % (en poids) d'alanine,
- 10 - environ 3 % (en poids) de valine,
- environ 3 % (en poids) de leucine,
- environ 2,5 % (en poids) de thréonine,
- environ 2,5 % (en poids) de tyrosine,
- moins d'environ 2 % (en poids) de proline,
- 15 - moins d'environ 2 % (en poids) de phénylalanine,
- moins d'environ 2 % (en poids) d'histidine,
- moins d'environ 2 % (en poids) d'arginine.

Les glycopeptides et glycoprotéines selon l'invention peuvent présenter également les caractéristiques suivantes :

- un titre anti-IIa est d'environ 8,5 UI/mg,
- un titre anti-Xa est d'environ 180 UI/mg.

Pour vérifier le poids moléculaire, on peut avoir recours à l'électrophorèse en utilisant un kit ou coffret de calibration.

Pour vérifier la composition des glycopeptides et glycoprotéines selon l'invention, on peut par exemple avoir recours aux méthodes suivantes.

30 La composition globale en acides aminés peut être déterminée par une méthode classique, telle que la méthode de LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L., RANDAL R. J. dans J. Biol. Chem., 193, 265-273, 1951.

La composition globale en sucres de ces molécules peut être déterminée par une méthode classiquement

utilisée dans laquelle on a recours à l'anthrone comme réactif, telle qu'elle est décrite notamment dans "Determination of dextran with anthrone", *Analyt. Chem.*, 25, p. 1 656-1 681, SCOTT T. A. and MELVIN, 1953.

5 Le réactif utilisé dans cette méthode, à savoir l'anthrone, est particulièrement sensible aux hexoses.

Le pH isoélectrique peut être déterminé par électrofocalisation telle qu'elle est décrite dans Anders Winter, Krishna Ek and Ulla-Birgitta Anderson :  
10 *Analytical Electrofocusing in thin layers of polyacrylamide gels*, LKB Application note 250, 1977..

L'homogénéité peut également être déterminée par électrofocalisation selon la méthode dont la référence est mentionnée ci-dessus.

15 En ce qui concerne le temps de thrombine (temps anti-IIa), qui est un type de mesure reflétant plutôt l'action des glycopeptides sur l'inhibition du facteur IIa, on se reportera aux ouvrages suivants : CAZENAVE, Introduction à l'étude de l'hémostase et de la thrombose, 1982 ; CAEN J., LARIEU N. J. et SAMAMA N., L'hémostase, méthodes d'exploration diagnostiques pratiques,  
20 1980.

En ce qui concerne le temps de céphaline-kaolin qui est un type de mesure reflétant plutôt l'action des  
25 glycopeptides et des glycoprotéines au niveau de la voie endogène, on se reportera également aux ouvrages cités ci-dessus.

En ce qui concerne le temps de Quick et le temps anti-Xa, on se reportera aux ouvrages cités ci-dessus.

30 L'invention concerne également un procédé, pour obtenir de tels glycopeptides et glycoprotéines, ce procédé étant caractérisé par :

- la séparation et la récupération du surnageant  
provenant d'un milieu de culture de myxobactéries du  
35 sous-ordre des Cystobacterinae ou de mutants de

celles-ci ;

- l'élimination à partir du surnageant des substances de poids moléculaires inférieurs à environ 1 000 daltons ;

5       - l'élimination à partir du surnageant des substances insolubles dans l'eau ;

- et la récupération de la fraction du surnageant débarrassée des substances de poids moléculaires inférieurs à environ 1 000 daltons et débarrassée des  
10 substances insolubles dans l'eau ;

- la purification de cette fraction par chromatographie sur colonne de pseudo-affinité ;

- la purification subséquente de la susdite fraction par chromatographie sur colonne de gel de  
15 polymère réticulé de dextrane.

La matière première à partir de laquelle les glycopeptides de l'invention peuvent être obtenus peut être constituée par le surnageant provenant d'un milieu de culture de myxobactéries du sous-ordre des  
20 Cystobacterinae ou de mutants de celles-ci, les Cystobacterinae étant caractérisées par le fait qu'elles produisent un mucus qui absorbe le rouge Congo.

Le milieu de culture de ces Cystobacterinae peut être constitué par un milieu solide ou liquide.

25       On a de préférence recours à un milieu de culture liquide.

La souche de myxobactéries utilisée est avantageusement constituée par une souche de Myxococcus xanthus.

30       La souche utilisée est par exemple la Myxococcus xanthus CMO11, qui dérive de la souche I448, par l'insertion (n° 11) d'un transposon Tn5, selon la technique classique décrite dans "Introduction of transposon Tn5 into Myxococcus for analysis of developmental and other  
35 non selectable mutants", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78,

425-429. La souche I448 a fait l'objet d'un dépôt le 3 mai 1985, à la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75015 PARIS (France).

5            Cette insertion confère à la souche notamment la capacité de produire 50 % de plus de sucres dans le milieu que la souche d'origine.

          A titre d'exemple, on peut également utiliser la souche DK1622, telle que décrite par D. KAISER dans  
10 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 5 952-5 956, 1979.

          Une telle souche peut être cultivée en milieu liquide, agité, constitué de Bactocasitone tamponnée commercialisée par la Société Difco.

          En ce qui concerne la séparation du surnageant,  
15 on prélève celui-ci de préférence au début de la phase stationnaire de croissance des myxobactéries, en d'autres termes, à la fin de la phase exponentielle de croissance.

          Les phases d'élimination des substances de poids  
20 moléculaires inférieurs à environ 1 000 daltons, ainsi que la phase d'élimination des substances insolubles peuvent être inversées.

          Selon un mode de réalisation préféré du procédé de l'invention, on élimine d'abord les substances de  
25 poids moléculaires inférieurs à environ 1 000 daltons.

          Pour éliminer les substances de poids moléculaires inférieurs à environ 1 000 daltons, on peut avoir recours à de l'alcool éthylique pur.

          L'addition d'alcool conduit à l'obtention d'un  
30 précipité qui contient les substances de poids moléculaires supérieurs à environ 1 000 daltons, notamment les glycopeptides selon l'invention, tandis que les substances de poids moléculaires inférieurs à environ 1 000 daltons, passent dans l'alcool.

35            La phase de traitement à l'alcool a également

pour but de concentrer le surnageant débarrassé des substances de poids moléculaires inférieurs à 1 000 daltons.

La phase de traitement à l'alcool peut être effectuée plusieurs fois, si l'on souhaite concentrer davantage.

De façon avantageuse, on traite le surnageant deux fois à l'alcool, ce qui signifie qu'après avoir obtenu un premier précipité à l'alcool, on le resolubilise dans l'eau, la phase aqueuse obtenue étant retraitée par une nouvelle addition d'alcool.

On peut ensuite laver le précipité obtenu ci-dessus à l'acétone, pour délipider partiellement, puis à l'éther, notamment pour sécher.

Après le traitement à l'acétone et à l'éther, on laisse avantageusement sécher le précipité.

La phase d'élimination des substances insolubles dans l'eau peut avoir lieu en suspendant le précipité séché dans de l'eau distillée, puis en effectuant une centrifugation.

Par substances insolubles, on désigne dans ce qui précède et dans ce qui suit, les substances faiblement solubles en milieu aqueux, et qui deviennent insolubles au cours de différentes étapes de procédé, en raison des phases de concentration.

On peut ensuite laver les substances insolubles avec de l'eau distillée et recentrifuger.

Puis, on a avantageusement recours à un traitement de purification pour éliminer les traces d'alcool, d'acétone et d'éther éventuellement utilisés dans les étapes précédentes.

Ce traitement de purification est avantageusement constitué par une ultrafiltration.

Cette étape de purification est avantageusement suivie d'une phase de concentration, par exemple sur

membrane.

Le produit obtenu à l'issue de cette étape de concentration peut être conservé après lyophilisation ou évaporation sous vide.

5 La phase d'élimination des substances insolubles peut avoir lieu à un moment quelconque entre la séparation du surnageant et la purification par chromatographie de pseudo-affinité, et a lieu de préférence après le séchage qui suit le lavage à l'acétone et à l'éther.

10 La phase d'élimination des substances insolubles peut également avoir lieu après l'obtention du lyophilisat, lequel est dissous dans l'eau, et centrifugé pour éliminer les substances insolubles.

En ce qui concerne la chromatographie de pseudo-affinité, elle désigne une chromatographie dans laquelle  
15 n'intervient pas seulement l'affinité, mais aussi la charge, et l'hydrophobicité des éléments chromatographiés (cf. L. AMOURACHE et T. A. VIJAYALAKSHMI, Affinity chromatography of kid chimosin on histidyl-sepharose,  
20 Journal of Chromatography, 303, 285-290, 1984).

On effectue avantageusement cette chromatographie de pseudo-affinité sur une colonne d'histidyl-(sépharose 4B). On utilise un tampon acétate à un pH d'environ 5,5. Cette chromatographie donne plusieurs  
25 fractions. On recueille la fraction présentant des propriétés anticoagulantes, telles que mesurées selon le test de coagulation sur sang total décrit ci-après.

On passe ensuite la fraction anticoagulante sur une colonne de gel de polymère réticulé de dextrane, tel  
30 que celui commercialisé sous le nom Sephadex G-25 par la Société Pharmacia Fine Chemicals.

Cette chromatographie permet notamment de se débarrasser du NaCl utilisé dans la chromatographie de pseudo-affinité et donne également plusieurs pics parmi  
35 lesquels l'un correspond aux glycopeptides et aux



glycoprotéines de l'invention possédant des propriétés anticoagulantes.

Selon un mode de réalisation préféré, le procédé d'obtention des glycopeptides et des glycoprotéines de  
5 l'invention comprend :

- la séparation du surnageant provenant d'un milieu de culture de myxobactéries du sous-ordre des Cystobacterinae ou de mutants de celles-ci, laquelle culture est au début de la phase stationnaire de croissance ;  
10
- l'addition d'alcool au susdit surnageant, ce qui conduit à l'obtention d'un précipité qui contient les glycopeptides et les glycoprotéines selon l'invention et qui est débarrassé des substances de poids moléculaires inférieurs à environ 1 000 daltons ;  
15
- le lavage du susdit précipité à l'acétone, puis à l'éther, puis le séchage du précipité ;
- la dissolution dans l'eau distillée du susdit précipité séché ;
- 20 - l'élimination des substances insolubles dans l'eau, notamment par centrifugation et l'obtention d'une solution contenant les glycopeptides et les glycoprotéines de l'invention et débarrassée des substances de poids moléculaires inférieurs à environ 1 000 daltons, et des substances insolubles dans l'eau ;  
25
- la purification par ultrafiltration et la concentration de la solution obtenue ci-dessus, ce qui conduit à l'obtention d'une fraction contenant les glycopeptides et les glycoprotéines ;
- 30 - la conservation de la susdite fraction par lyophilisation ou évaporation sous vide ;
- la purification par chromatographie sur colonne de pseudo-affinité de la susdite fraction ;
- la purification subséquente par chromatographie sur colonne de gel de polymère réticulé de  
35

dextrane, notamment de gel commercialisé sous le nom Sephadex.

Selon un autre mode de réalisation préféré du procédé selon l'invention, celui-ci comprend en plus des  
5 étapes ou phases décrites ci-dessus, une étape d'élimination des protéines. Cette étape a lieu avant l'étape de purification par chromatographie, à un moment quelconque entre la séparation du surnageant du milieu de culture des myxobactéries et la purification par chromatographie sur colonne de pseudo-affinité.  
10

L'élimination des protéines peut avoir lieu par exemple en utilisant du phénol, mais peut également avoir lieu en utilisant une membrane qui permet d'éliminer les substances de poids moléculaires supérieurs à  
15 10 000 daltons.

Si on utilise le phénol pour éliminer les protéines, il se produit un précipité qui contient les protéines à éliminer, tandis que les glycopeptides et les glycoprotéines selon l'invention se trouvent dans la  
20 phase aqueuse obtenue.

Le phénol utilisé est du phénol d'environ 40 à environ 70 % (poids/volume) et est de préférence du phénol à environ 50 % (poids/volume).

Selon un mode de réalisation préféré, le procédé  
25 de l'invention comprend :

- la séparation et la récupération du surnageant provenant d'un milieu de culture de myxobactéries du sous-ordre des Cystobacterinae ou de mutants de celles-ci ;
- 30 - l'élimination à partir du surnageant ainsi récupéré :
  - . des protéines,
  - . des substances de poids moléculaires inférieurs à environ 1 000 daltons,
  - 35 . des substances insolubles dans l'eau ;

pour donner l'extrait brut,

- la purification par chromatographie sur colonne de pseudo-affinité de l'extrait brut ;

- la purification subséquente par chromatographie sur colonne de gel commercialisé sous le nom Sephadex.

Un mode de réalisation préféré du procédé de l'invention, pour obtenir les glycopeptides et les glycoprotéines selon l'invention, comprend les étapes suivantes :

- la séparation et la récupération du surnageant provenant d'un milieu de culture de myxobactéries appartenant au groupe produisant un mucus colorable au rouge Congo, laquelle culture est au début de la phase stationnaire de croissance ;

- l'addition au surnageant de phénol à 50 % (poids/volume), qui conduit à :

- . l'obtention d'un précipité contenant les protéines ;

- . et à l'obtention d'une phase aqueuse contenant les glycopeptides et les glycoprotéines selon l'invention ;

- la séparation des phases et la récupération de la phase aqueuse qui contient les glycopeptides et les glycoprotéines selon l'invention ;

- l'addition d'alcool à la susdite phase aqueuse qui conduit à l'obtention d'un précipité qui contient les glycopeptides et les glycoprotéines selon l'invention et qui est débarrassé des protéines et des substances de poids moléculaires inférieurs à environ 1 000 daltons ;

- le lavage du susdit précipité à l'acétone, puis à l'éther, puis le séchage du précipité ;

- la dissolution dans l'eau distillée du susdit précipité séché;

- l'élimination des substances insolubles dans l'eau, notamment par centrifugation et l'obtention d'une solution contenant les glycopeptides et les glycoprotéines de l'invention et débarrassée des substances de poids moléculaires inférieurs à environ 1 000 daltons, des protéines et des substances insolubles dans l'eau ;

- la purification par ultrafiltration et la concentration de la solution obtenue ci-dessus, ce qui conduit à l'obtention d'un extrait brut contenant les glycopeptides et les glycoprotéines ;

- la conservation du susdit extrait brut par lyophilisation ou évaporation sous vide ;

- la purification par chromatographie sur colonne de pseudo-affinité de l'extrait brut ;

- la purification subséquente par chromatographie sur colonne de gel commercialisé sous le nom Sephadex.

De façon avantageuse, le traitement à l'alcool de la phase aqueuse contenant les glycopeptides et les glycoprotéines selon l'invention peut être effectué successivement deux fois.

De façon avantageuse, on peut laver avec de l'eau distillée les substances insolubles obtenues et procéder à une centrifugation.

Selon un mode de réalisation avantageux, le procédé d'obtention des glycopeptides et des glycoprotéines de l'invention comprend en outre une étape dans laquelle on traite le surnageant afin d'éliminer les protéases, notamment par chauffage à environ 100°C, pendant un temps suffisant, par exemple pendant environ 2 à environ 5 mn.

On indique ci-après un procédé de dénaturation des protéases et d'extraction des glycopeptides de l'invention. Ce procédé comprend les étapes suivantes :

- l'élimination des bactéries par centrifugation

- à 8 000 g pendant 15 minutes, à partir d'une culture de  
préférence en début de phase stationnaire de croissance,
- la mise en contact du surnageant de culture  
récupéré dans un bain d'eau bouillante à 100°C pendant 2
  - 5 à 5 minutes tout en agitant en permanence,
  - le refroidissement du surnageant dans un bain  
d'eau glacée, avec agitation,
  - la lyophilisation du surnageant,
  - la dissolution de la poudre (obtenue par la
  - 10 lyophilisation ci-dessus) dans le PBS (Phosphate  
Buffered Saline) à pH 7,2, à raison d'un ml de PBS pour  
10 ml de surnageant initial,
  - l'addition au concentrat obtenu de 3 volumes  
d'alcool 95° et la mise au repos pendant une nuit à
  - 15 -20°C,
  - la centrifugation à 8 000 g pendant 15 minutes  
et l'élimination de la phase aqueuse,
  - la resuspension du précipité dans l'eau dis-  
tillée,
  - 20 - la reprecipitation avec 3 volumes d'alcool 95°  
à -20°C pendant au moins 4 heures,
  - le lavage du précipité à l'acétone et à  
l'éther,
  - le séchage sur une paillasse à flux laminaire
  - 25 à la température ambiante,
  - la resuspension dans l'eau distillée,
  - l'élimination des substances insolubles dans  
l'eau par centrifugation pendant 4-5 minutes à 160 g,
  - le lavage à 2 reprises des substances inso-  
30 lubles à l'eau distillée et la centrifugation comme  
précédemment,
  - la filtration de la solution sur une membrane  
Amicon 1000D, à la température ambiante,
  - la lyophilisation,
  - 35 - la mise en oeuvre des étapes de purification

par chromatographie.

Exemple 1

L'exemple 1 ci-après est relatif à l'obtention d'un glycopeptide selon l'invention.

5 La souche de myxobactéries utilisée est la souche Myxococcus xanthus CMO11.

Les cellules sont cultivées en milieu liquide (10 g/l de Bactocasitone commercialisé par Difco ; 8 mM  $\text{SO}_4\text{Mg}$  ; Tris [(hydroxyméthyl)amino-méthane / pH 7,6  
10 10 mm ; tampon phosphate pH 7,6 1 mM) à 30°C sous forte aération (agitation rotative à 300 rpm en erlen ou fermenteur de 7 l).

On prend la culture de myxobactéries en début de phase stationnaire de croissance et on centrifuge à  
15 8 000 g pendant environ 15 à 30 minutes pour éliminer les bactéries et récupérer le surnageant du milieu de culture.

On ajoute au surnageant un volume de phénol à 50 % (poids/volume) dans l'eau distillée.

20 On agite énergiquement et on laisse agir à 60°C pendant 5 minutes.

On refroidit directement à 0°C dans un mélange réfrigérant (glace + eau) et on laisse reposer pour séparer la phase aqueuse du précipité qui s'est formée  
25 suite à l'addition de phénol.

On prélève la phase aqueuse qui contient le glycopeptide selon l'invention, on centrifuge à 1 500 g à 0°C pendant 2 à 3 minutes et on récupère la phase aqueuse.

30 On effectue un second traitement au phénol en ajoutant du phénol à 50 % à la phase aqueuse qui vient d'être obtenue.

On traite ensuite la phase aqueuse avec 5 volumes d'alcool 95° à -20°C pendant une nuit, ce qui permet  
35 de précipiter le glycopeptide de l'invention et

d'éliminer le phénol et de concentrer.

On centrifuge à 3 000 g et à 0°C pendant 15 à 30 minutes.

On resuspend le précipité dans un petit volume  
5 d'eau distillée et on reprécipite avec 3 volumes d'alcool 95° à -20°C (comme précédemment).

On lave le précipité obtenu à l'acétone, ce qui permet notamment de délipider partiellement, d'éliminer le phénol restant éventuellement, puis à l'éther (à  
10 -20°C), ce qui permet d'éliminer le phénol restant éventuellement et on le sèche par exemple sur une pailasse à flux laminaire.

On redissout le précipité dans l'eau distillée.

On élimine les substances insolubles dans l'eau  
15 par centrifugation pendant 4-5 minutes à 160 g.

On lave les substances insolubles avec de l'eau distillée et on centrifuge comme précédemment.

On ultrafiltre pour éliminer notamment l'alcool, l'acétone et l'éther et on concentre par exemple en  
20 utilisant une membrane Amicon 1000D.

On obtient ainsi ce que l'on a précédemment appelé l'extrait brut (et qui sera ci-après appelé extrait phénolique brut en raison de l'utilisation du phénol indiquée ci-dessus) qui contient le glycopeptide selon  
25 l'invention.

La figure 1 représente la courbe 1 relative à la chromatographie de pseudo-affinité sur histidyl-(sépharose-4B) de l'extrait brut.

On a représenté sur l'axe des abscisses, les volumes d'élution en ml et sur l'axe des ordonnées, à  
30 droite, la concentration molaire en NaCl et sur l'axe des ordonnées à gauche, la densité optique mesurée à 280 nm.

La colonne utilisée a pour dimensions 1 x 25 cm.  
35 L'échantillon est constitué par 25 mg d'extrait

phénolique brut lyophilisé dans 1 ml de tampon.

L'éluant est constitué par du tampon acétate 0,1 M. Le pH est de 5,5 et le gradient de NaCl est un gradient par palier de 0 à 0,75 M. Le débit est de 12 ml à l'heure.

Cette séparation conduit à l'obtention de cinq fractions correspondant aux cinq pics respectivement désignés par I, II, III, IV et V sur la figure 1.

Le pic II obtenu avec NaCl 0,1 M dans le tampon correspond à une fraction présentant des propriétés anticoagulantes et contient le glycopeptide selon l'invention.

La figure 2 représente la courbe 2 relative à la filtration sur gel commercialisé sous le nom Séphadex G-25 des différentes fractions obtenues par histidyl-sépharose.

On a représenté sur l'axe des abscisses le volume d'élution en ml, sur l'axe des ordonnées, la densité optique mesurée à 280 nm.

La colonne a une dimension de 1 x 22 cm.

L'éluant est constitué par de l'eau distillée et le débit est de 16 ml/heure.

Le glycopeptide selon l'invention correspond au pic représenté par II(2) sur la figure 2.

La flèche (↓) indique le début de chaque élution.

La pureté du glycopeptide selon l'invention est vérifiée par électrofocalisation (cf. Anders Winter, Krishna Ek, Ulla-Birgitta Anderson, Analytical Electrofocusing in thin layers of polyacrylamide gels, LKB Application Note 250, 1977).

Le glycopeptide selon l'invention représente environ 2 % du susdit extrait phénolique brut.

#### Exemple 2

Cet exemple est relatif à l'obtention du



glycopeptide obtenu à partir de l'extrait phénolique brut mentionné ci-dessus.

On a isolé le glycopeptide selon l'invention à partir de l'extrait phénolique brut obtenu notamment  
5 comme indiqué ci-dessus, à l'aide d'une colonne de silice connue sous la désignation (C8-RP300), en fonction de l'hydrophobicité.

En présence ou absence de SDS (sodium dodécyl sulfate), il présente essentiellement deux pics conte-  
10 nant à la fois des résidus sucres et peptides. Le glycopeptide selon l'invention est contenu dans la fraction correspondant au pic le plus hydrophile (65 % en masse), la fraction correspondant à l'autre pic contient un principe coagulant.

15 Le sodium dodécyl sulfate élimine l'activité anticoagulante du premier pic, mais n'en modifie pas la migration.

### Exemple 3

Cet exemple est relatif à l'obtention des gly-  
20 copeptides selon l'invention en ayant recours au procédé indiqué ci-dessus dans lequel on effectue uniquement la précipitation à l'alcool.

Ce procédé ne diffère de celui déjà décrit à l'exemple 1 que par l'élimination de l'étape correspondant à la précipitation à l'aide du phénol. La séparation  
25 du glycopeptide est rendue possible par une chromatographie de pseudo-affinité sur un gel d'histidyl-sépharose suivie par une filtration sur gel G-25 dans les conditions déjà décrites à l'exemple 1. L'homogénéité du produit a été vérifiée par électrofocalisation et son pH  
30 isoélectrique déterminé (environ 3,6).

On indique ci-après, en détail, les protocoles d'extraction et de purification.

- On prend la culture de Myxococcus xanthus  
35 CM011 au début de la phase stationnaire de croissance.

- On élimine les cellules par centrifugation à 8 000 g pendant 15 à 30 minutes et on récupère le surnageant.
- On traite le surnageant avec 3 volumes d'alcool à 95°C et on laisse pendant 4 heures ou une nuit à -20°C.
- Pour séparer le précipité formé de la phase aqueuse, on centrifuge la phase aqueuse à 8 000 g pendant 15 à 30 minutes et on élimine la phase aqueuse.
- On resuspend le précipité dans de l'eau distillée.
- On reprécipite la phase aqueuse avec 3 volumes d'alcool à 95°C à -20°C pendant au moins 4 heures.
- On lave le précipité obtenu à l'acétone puis à l'éther.
- On laisse sécher le précipité sur une pailasse à flux laminaire à la température ambiante.
- On suspend le précipité dans de l'eau distillée.
- On élimine les substances insolubles dans l'eau par centrifugation pendant 4-5 minutes à 160 g.
- On lave les substances insolubles avec de l'eau distillée et on centrifuge comme précédemment.
- On filtre la solution sur une membrane Amicon 1000D, à la température ambiante.
- On lyophilise, ce qui conduit à l'obtention d'un lyophilisat.
- On procède ensuite à une chromatographie de pseudo-affinité du lyophilisat sur histidyl-(sépharose 4B).
- On procède ensuite à une filtration sur une colonne de gel commercialisée sous le nom Sephadex G-25 des différentes fractions obtenues sur histidyl-(sépharose-4B).
- Le gel utilisé est la sépharose-4B,

commercialisée par Pharmacia Fine Chemicals, couplée à un ligand L-histidine, commercialisé par la Société Sigma.

On a représenté respectivement sur les figures 3 et 4, les courbes relatives à la chromatographie de pseudo-affinité et de filtration sur gel G-25, pour l'obtention du glycopeptide selon l'invention.

La figure 3 représente les trois pics (I, II, III) obtenus par la séparation sur histidyl-(sépharose 4B).

On a représenté sur l'axe des abscisses le volume d'élution exprimé en ml, sur l'axe des ordonnées, à droite, la concentration en NaCl et à gauche la densité optique à 280 nm.

La colonne utilisée a comme dimensions 2,5 x 16 cm.

L'échantillon est constitué par 1 g de lyophilisat dans 10 ml de tampon.

L'éluant est un tampon acétate 0,1 M, pH 5,5, le débit est de 48 ml/heure.

L'élution est faite avec un gradient de NaCl (0-0,75 M) dans le tampon.

C'est dans la fraction correspondant au pic III que se trouve le glycopeptide présentant des propriétés anticoagulantes selon l'invention, éluée avec NaCl 0,1 M dans le tampon.

La fraction correspondant au pic III obtenu sur séparation histidyl-(sépharose 4B) est concentrée par ultrafiltration sur membrane Amicon 1000D et est filtrée sur gel G25.

La figure 4 représente la filtration sur gel G-25 du pic III obtenue précédemment.

On a représenté en abscisses le volume d'élution exprimé en ml, et en ordonnées, la densité optique à 280 nm.

La colonne utilisée est une colonne de 1x25 cm.

L'éluant est de l'eau distillée.

Le débit est de 16 ml/heure.

Le glycopeptide présentant des propriétés anti-  
5 coagulantes selon l'invention, correspond au pic III<sub>1</sub>.

Analyse du glycopeptide

La fraction peptidique a été mise en évidence  
après dosage des protéines totales selon la méthode de  
Lowry.

10 Selon cette méthode, le glycopeptide contient  
79-80 % (en poids) de résidus acides aminés.

La partie glucidique du glycopeptide de l'in-  
vention correspond à 20 % environ (en poids) de glucides  
totaux.

15 La fraction glucidique a été analysée par chro-  
matographie en phase gazeuse après méthanolyse.

La technique de méthanolyse est la suivante.

Pour déterminer la composition de 20 µg de su-  
cres :

20 - on met 2 µg de mésoinositol (témoin interne) à  
1 µg/ml dans de l'eau distillée ;

- on lyophilise ;

- on met 500 µl de méthanol anhydre 0,5 N/HCl et  
on laisse à 95°C pendant 24 heures ;

25 - on sort les tubes du four pour arrêter la mé-  
thanolyse, on laisse refroidir à la température ambiante  
et on neutralise jusqu'à ce que le pH final soit de 6-7;

- on met 20 µl d'anhydride acétique dans le mé-  
lange, on agite et on laisse réagir pendant une nuit ;

30 - on centrifuge à 250 g, on élimine l'insoluble  
et on ajoute sur le surnageant de l'heptane (250 µl), on  
agite et on enlève l'heptane qui est non miscible avec  
le méthanol, afin d'extraire les traces de lipides ;

- on répète cette extraction plusieurs fois ;

35 - on sèche à l'azote ;

- on silyle pour stabiliser les produits et les rendre plus volatils ;

- on met 100  $\mu$ l de pyridine et 100  $\mu$ l de BSTFA (CN,O-bis-(triméthylsilyl)-trifluoroacétamide), on laisse à l'obscurité pendant 4 heures ;

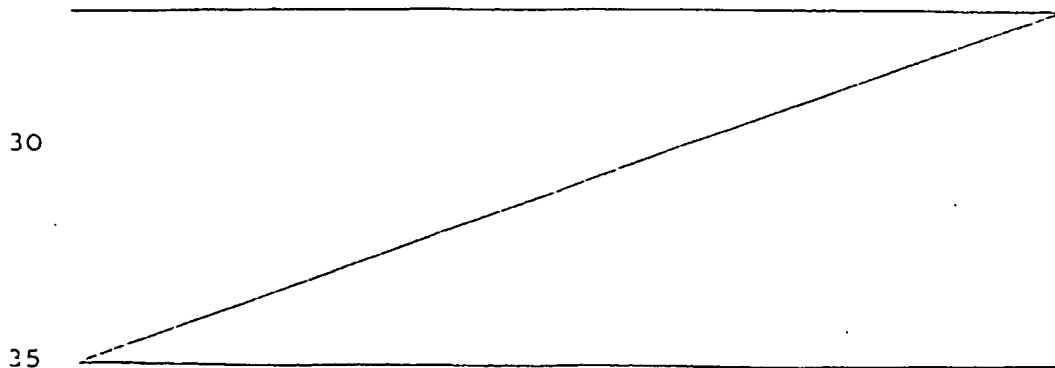
- on injecte sur une colonne de OV101 Cp Sil 5 CB Chrompack, la température est programmée de 120 à 240°C, à raison de 2°C/mn, sous un débit de gaz vecteur (azote) de 10 ml/mn.

La composition centésimale (en poids) de cette fraction en résidus sucres est donnée dans le tableau suivant.

	Glc	Man	Gal	Glc Nac	Gal Nac
	34,9 %	16,3 %	11,4 %	23,3 %	14,1 %
15	62,6 % de sucres neutres			37,4 % d'osamines	
	Glc = glucose		Glc Nac = N-acétylglucosamine		
	Man = mannose		Gal Nac = N-acétylgalactosamine		
	Gal = galactose				

L'analyse des acides aminés est effectuée à l'aide d'un autoanalyseur Beckman multichrom selon la technique de Spakman et Coll (SPAKMAN D.H., STEIN W.A and TIOORE S. 1958 automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino-acids. Analyt. Chem. 30 : 1190).

La composition centésimale (en poids) de cette fraction en résidus d'acides aminés figure ci-après :



Acides aminés		
	Glu	31 %
	Ser	28 %
	Asp	7 %
5	Gly	6 %
	Ile	5,5 %
	Ala	5 %
	Val	3 %
	Leu	3 %
10	Thr	2,5 %
	Tyr	2,5 %
	Pro	< 2 %
	Lys	< 2 %
	Phe	< 2 %
15	His	< 2 %
	Arg	< 2 %

D'autres acides non mentionnés ici ont été détectés à l'état de traces.

Détermination du poids moléculaire et du caractère  
 20 glycopeptidiques du glycopeptide de l'invention

Le poids moléculaire estimé par un procédé d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (urée-SDS-PAGE) est d'environ 6 300 D. (figure 1C).

Le procédé "Urée-SDS-PAGE" est réalisé selon un  
 25 protocole fourni par PHARMACIA sur un gel de 13,4 % d'acrylamide et de 1 mm d'épaisseur. L'urée est introduite à une concentration de 8 M dans le gel de résolution et de 4 M dans le gel de concentration.

Les tampons sont du tris-glycine 2 M, pH 8,8  
 30 pour le gel de résolution et du tris-glycine 0,5 M, pH 6,8 pour le gel de concentration. Les échantillons sont solubilisés dans un tampon tris 0,5 M, pH 6,8 contenant

- du sodium dodécylsulfate (SDS) (4 %),
- du mercaptoéthanol (1 %),
- 35 - de l'urée 7 M,

- du saccharose (12 %),  
puis sont portés à 100°C pendant 5 mn.

Sur la figure 7, on a représenté en

- 5 1 la bande correspondant à la myoglobine (17200 D)  
2 la bande correspondant à la myoglobine I et II  
(14600 D)  
3 la bande correspondant à la myoglobine I (9240 D)  
4 la bande correspondant à la myoglobine II (6380 D)  
10 5 la bande correspondant à la myoglobine III (2560 D)

Sur la figure 7,

- la bande a1 correspond à une concentration  
0,8 mg/ml du glycopeptide de l'invention,  
- la bande a2 correspond à une concentration  
15 1 mg/ml du glycopeptide de l'invention,  
- la bande a3 correspond à une concentration  
2 mg/ml du glycopeptide de l'invention.  
- la bande b correspond au kit de calibration.

20 La détermination de l'homogénéité du produit et  
du caractère glycopeptidique du glycopeptide a été réa-  
lisée par une électrofocalisation sur gel d'acrylamide à  
5 % (PHARMACIA) suivie d'une coloration à l'argent selon  
deux techniques différentes. La première est celle com-  
mercialisée par BIORAD, pour la coloration des peptides  
25 (MERRIL C. R., GOLDMAN D., DESMAN S.A., and EBERT M. H.  
1981 "Ultrasensitive stain for proteins in polyacryla-  
mides gels shows regional variation in cerebrospiral  
fluid proteins, Science 211 : 1437-1438).

30 La deuxième comprenant une étape d'oxydation  
périodique, permet de révéler spécifiquement les  
sucres (DUBRAY G. and BEZARD G. 1982, "A highly  
sensitive periodic acid-silver stain for 1,2-Diol groups  
of glycopeptides and polysaccharides in polyacrilamide  
gels. Anal. Biochem. 119 : 325-329).

35 Dans les deux cas, la même bande a été révélée  
dans le gel ce qui constitue une preuve en faveur de la

nature glycopeptidique de la substance (figures 5A et 5B).

5 Plus précisément, on a représenté en 5A l'électrofo-  
trofocalisation suivie de la coloration des peptides  
selon la première méthode indiquée ci-dessus.

On a représenté en 5B l'électrofofocalisation  
suivie de la coloration à l'argent et comprend une étape  
d'oxydation périodique pour révéler les sucres, selon la  
10 deuxième méthode indiquée ci-dessus.

La bande a correspond au glycopeptide de l'in-  
vention tandis que la bande b correspond à la bande de  
contrôle du kit de calibration.

Sur les figures 5A et 5B, on a représenté par  
15 1 la bande correspondant à la lectine de lentille - ban-  
de intermédiaire (pI = 8.45)  
2 la bande correspondant à la bande de base de la  
myoglobine (pI = 7.35)  
3 la bande correspondant à l'anhydrase carbonique  
20 humaine B (pI = 6.55)  
4 la bande correspondant à la  $\beta$ -lactoglobuline A (pI =  
5.2)  
5 la bande correspondant à l'amyloglucosidase (pI = 3.5)

On a représenté, sur la figure B, la détermina-  
25 tion plus fine du point isoélectrique.

Sur la figure 6,

1 correspond à la bande de l'anhydrase carbonique bovine  
(pI = 5.85)  
2 correspond à la bande de la glucose oxydase (pI =  
30 4.15)  
3 correspond à la bande de l'amyloglucosidase (pI =  
3.50)  
4 correspond à la bande du pepsinogène (pI = 2.80)

#### Propriétés des glycopeptides selon l'invention

35 L'effet des glycopeptides sur la coagulation a  
été investigué et leurs propriétés anticoagulantes ont



été déterminées par un ensemble de tests de coagulation.

L'héparine qui a été utilisée à titre de comparaison est de l'héparine commercialisée par CHOAY S. A., de 10 300 daltons et de 173USP.

- 5           On rappelle qu'une unité internationale (UI) est définie comme étant la quantité de substance (en l'occurrence de glycopeptide) qui attaque une micromole de substrat par minute et qu'une unité catalytique (Ukat) est la quantité de substance (en l'occurrence de glycopeptide) qui attaque une mole de substrat par seconde.

10           Le glycopeptide selon l'invention à propos duquel les résultats figurent ci-après est celui obtenu dans l'exemple 3.

- 15           L'activité anticoagulante, déterminée par le temps de Howell est exprimé en unité internationale par mg de poids sec. Une unité internationale est définie comme étant la quantité de substance ayant le même effet sur le temps de coagulation qu'une unité internationale d'héparine.

- 20           Il faut ajouter qu'aucun signe de cytotoxicité n'a été constaté par des tests préliminaires effectués in vitro sur des fibroblastes de poumon de poulet.

Ces différents résultats proviennent des essais tels que décrits ci-dessous.

- 25   Exploration de la voie endogène de la coagulation :

a- APTT ou temps de céphaline kaolin

- 30           C'est le plus sensible des tests de la voie endogène. Il correspond au temps de coagulation d'un plasma qui est récalcifié en présence de céphaline et d'un activateur des facteurs de contact. L'activateur a longtemps été du kaolin, surface électronégative qui active fortement le système contact dont le premier événement est l'activation et l'acquisition d'une activité enzymatique par le facteur XII

- 35   (Facteur Hageman).

Ce temps explore tous les facteurs de la voie endogène.

Protocole expérimental : à 0,1 ml de PPP (plasma pauvre en plaquettes) préincubé à 37°C, on ajoute :

- 5           - 0,1 ml de tampon de Michaelis, pH 7.3 ou d'anticoagulant dans le tampon à différentes concentrations,
  - on incube pendant 3 minutes à 37°C,
  - on déclenche la coagulation par l'addition de
- 10 0.1 ml d'activateur (céphaline + kaolin, commercialisé sous le nom C.K., Prest 2, par la Société Diagnostica stago I) et 0.1 ml de  $\text{CaCl}_2$  M/40,
  - on mesure le temps de coagulation à l'aide d'un coagulomètre (KCl Dade).

15           b- Temps de HOWELL

- Il correspond au temps de coagulation d'un plasma pauvre en plaquettes recalcifié. C'est un test voisin dans son principe du temps de coagulation sur sang total, sauf que la plasma est pauvre en plaquettes ; il est plus court et ne dure environ que 2 à 3 minutes. Cette différence est liée à l'activation in vitro des facteurs de contact. Cette activation est indépendante et peut donc survenir dans le tube du prélèvement, malgré le citrate qui décalcifie le sang.
- 20
- 25 Lorsque l'on restitue le calcium au plasma au moment de la réalisation du test, la cascade enzymatique démarre au niveau du facteur IX.

Protocole expérimental

A 37°C

- 30           - on incube pendant 3 minutes 0,1 ml de PPP avec 0.1 ml de tampon ou de produit à tester dans le tampon à concentrations variables,
  - on ajoute 0.1 ml de  $\text{CaCl}_2$  M/40 pour déclencher le phénomène de coagulation,
- 35           - on chronomètre.

## II EXPLORATION DE LA VOIE EXOGENE DE LA COAGULATION

Un seul test explore la voie exogène, le temps de Quick. Il correspond au temps de coagulation d'un plasma que l'on recalcifie en présence de thromboplastine tissulaire, source de facteur III. La néoplastine (Diagnostica Stago) préparée à partir de tissu cérébral frais, est la seule thromboplastine qui permet d'explorer sélectivement, en toutes circonstances, la prothrombine et ses cofacteurs constituant ce qu'on appelle le complexe prothrombinique (II,V,VII,X).

Protocole

- À 0,1 ml de plasma préincubé à 37°C, on ajoute 0,1 ml de tampon ou d'anticoagulant à différentes concentrations dans le tampon,
- on laisse agir pendant 5 mn à 37°C,
- on introduit dans le mélange réactionnel 0,2 ml de néoplastine portée au préalable à 37°C dans un bain-marie,
- on mesure au coagulomètre le temps que met le caillot plasmatique à se former.

## III TEMPS DE THROMBINE

Le temps de thrombine (TT) correspond au temps de formation d'un caillot après addition de thrombine dans un échantillon de plasma ou une solution de fibrinogène, en présence ou en l'absence de glycopeptide de l'invention.

L'héparine Lot H 108 commercialisé par "CHOAY" est testée dans les mêmes conditions afin de servir d'élément de comparaison.

Le système expérimental est le suivant :

- 0,2 ml de plasma pauvre en plaquettes (PPP) ou de fibrinogène (4 g/l) est incubé à 37°C avec :
- 0,1 ml de tampon de Michaelis contenant le glycopeptide de l'invention ou l'héparine en concentration initiale C variable, le temps témoin étant

déterminé avec un même volume de tampon exempt de produit, la durée d'incubation étant de 5 mn,

- 0,1 ml de solution de thrombine commercialisé par "Roche" et présentant les caractéristiques suivantes
- 5 56,4 u.NIH/mg (pour usage in vitro), gardée à 4°C dans du tampon de Michaelis est ajouté et le temps d'apparition du caillot (TT) est mesuré.

Les mesures sont faites à l'aide du coagulomètre.

#### 10 IV EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTI Xa

Elle consiste à mesurer l'effet potentialisateur du glycopeptide de l'invention, ayant l'héparine comme témoin, sur le pouvoir anti Xa plasmatique par méthode chronométrique.

- 15 Le complexe héparine-antithrombine III exerce une action inhibitrice sur les sérines protéases de l'hémostase. L'action inhibitrice sur le facteur Xa est largement responsable de l'action anticoagulante de l'héparine particulièrement aux faibles doses.

- 20 Le dosage se décompose en 3 temps :

1- Formation du complexe AT III-héparine par addition d'AT III purifiée à l'héparine selon le schéma suivant

ATIII + héparine ---> AT III - héparine

- 25 2- Action inhibitrice du complexe formé, sur un excès connu de facteur Xa purifié suivant le schéma suivant

ATIII-Hép.+Xa en excès----> ATIII-Hép.-(Xa)+Xa résiduel

- 30 3- Mesure de l'activité enzymatique du facteur Xa résiduel par son action coagulante sur un plasma substrat suivant le schéma suivant

Xa résiduel + plasma substrat ---> caillot de  
fibrine

Activité anti-Xa

- 35 \* les réactifs sont les suivants : Facteur Xa

purifié reconstitué par 1 ml d'eau distillée et gardé à 4°C,

HEPACLOT 10 STAGO : antithrombine III purifiée reconstituée par 0,5 ml d'eau distillée et placée à 4°C

5 . plasma substrat spécialement traité redissous dans 1 ml d'eau distillée et incubé à 37°C

\* L'étalonnage est effectué avec la calciparine CHOAY (173 UI/mg dans une gamme de 0 - 0,5 UI/ml).

10 \* Mode opératoire : on considère que cette héparine titre par définition 173 Unités anti Xa/mg. Dans un tube plastique à 37°C, on met

- 50 µl de tampon de Michaelis, de l'héparine ou du glycopeptide de l'invention dans le même volume du  
15 tampon à concentrations initiales variables,

- 50 µl d'antithrombine III, et on incube pendant 60 sec à 37°C,

- on ajoute : 100 µl de facteur Xa et on incube exactement pendant 90 sec,

20 100 µl de plasma substrat (à 37°C) et on incube pendant 30 sec,

- on déclenche le phénomène de coagulation par l'addition de 100 µl de  $\text{CaCl}_2$  M/40 préincubé à 37°C,

- on note le temps de coagulation.

## 25 V TEMPS DE REPTILASE (TR)

C'est le temps de coagulation du plasma citraté en présence de reptilase R (Diagnostica Stago). Le réactif est constitué par la fraction thrombine extraite du venin du serpent Biotrops Atrox. Contrairement à la  
30 thrombine, la reptilase n'est pas sensible à l'héparine et n'est pas inhibée par l'AT III. Elle est capable de provoquer la polymérisation du fibrinogène. Le temps de reptilase permet donc d'évaluer la capacité d'une substance de modifier ou non la transformation du fibrinogène  
35 ne en fibrine.

Description du test

Ce test consiste à incuber à 37°C 0,2 ml de fibrinogène 4 mg/ml (CRTS - Lille) avec 0,1 ml de tampon. Le glycopeptide de l'invention ou l'héparine  
5 sont dissous dans un même volume de tampon à différentes concentrations et ajoutés à 0,2 ml de fibrinogène 4 mg/ml.

Après incubation de 3 mn, on ajoute 0,1 ml de reptilase (lyophilisée, remise en solution dans l'eau  
10 distillée et gardée à 4°C) au mélange réactionnel pour déclencher le phénomène de coagulation et le temps de formation du caillot de fibrine est mesuré.

## RESULTATS

1- APTT ou temps de céphaline kaolin

15 L'héparine "CHOAY Lot H-108, 10700D" est choisie comme référence et son effet au niveau de cette voie est aussi bien évalué que celle du glycopeptide.

On a rassemblé dans le tableau 1, ci-après, les valeurs de l'APTT à différentes concentrations d'hépa-  
20 rine.

Tableau 1

	HEPARINE(µg/ml)	0	0,15	0,23	0,58	0,87	2,89	5,78	6,35
25	Moyenne des temps de coagulation (secondes)	67,5	69,9	80	95,3	110	237,5	440	∞

30 On a rassemblé dans le tableau 2, ci-après, les valeurs l'APTT à différentes concentrations de glycopeptide de l'invention.

Tableau 2.

5	glycopep- (µg/ml) tide de l'invention	0	10	20	40	50	75	90	100
10	Moyenne des temps de coagulation (secondes)	67,5	64	62,9	85	93,5	136,2	201	∞

D'après ces résultats, on décèle une propriété  
 15 procoagulante manifestée par le glycopeptide de l'in-  
 vention à des concentrations inférieures à 30 µg/ml. Au  
 delà de cette concentration, le glycopeptide de l'inven-  
 tion allonge le temps de céphaline kaolin jusqu'à empê-  
 cher complètement la formation du caillot à partir de  
 20 100 µg/ml. L'héparine quant à elle n'a pas cet effet  
 procoagulant et à 6,35 µg/ml totalement la coagulation.

Cette comparaison nous permet de définir l'acti-  
 vité du glycopeptide de l'invention par rapport à celle  
 de l'héparine.

25 En effet, le glycopeptide de l'invention évalué  
 par l'APTT est environ 42 fois moins actif que l'hépari-  
 ne. La concentration aboutissant à l'allongement de 2  
 fois de l'APTT était de 70 µg/ml pour le glycopeptide de  
 l'invention et 1,06 µg/ml pour l'héparine.

#### 30 2- Temps de QUICK

On évalue par ce test l'action du glycopeptide  
 de l'invention au niveau du complexe prothrombinique  
 (II, V, VII, X), prenant l'héparine CHOAY comme  
 référence, les résultats figurent dans les tableaux 3 et  
 35 4 pour l'héparine et le glycopeptide de l'invention

respectivement.

Tableau 3

Temps de quick à différentes concentrations du  
glycopeptide de l'invention

5

10	HEPARINE ( $\mu\text{g/ml}$ )	0	2,89	5,78	14,45	28,90	43,35	57,80	75,25	86,70
	Moyenne des temps de coagulation (secondes)	16,7	16,5	16,6	17	17,7	21,4	35,8	118,9	$\infty$

15

Tableau 4

Temps de quick à différentes concentrations de  
glycopeptide de l'invention

20

25	glycopep- ( $\mu\text{g/ml}$ ) tide de l'invention	0	25	50	80	120	160	200	240
	moyenne des temps de coagulation (secondes)	16,7	16,5	16,8	19,5	21	35,5	116	$\infty$

30

La concentration en glycopeptide de l'invention  
nécesssaire pour doubler le temps de QUICK est de 152  
35  $\mu\text{g/ml}$  environ, alors que celle de l'héparine capable de



produire le même effet est de 56 µg/ml, ce qui amène à conclure que sur la voie exogène de la coagulation, l'activité de l'héparine est 2,7 fois celle du glycopeptide de l'invention.

- 5            3- Temps de thrombine (TT) sur plasma
- Ce test permet d'évaluer l'activité antithrombique de l'anticoagulant dans un milieu plasmatique, hétérogène et en présence de l'antithrombique III présente normalement dans le plasma. Les résultats
- 10 relatifs à l'héparine et à le glycopeptide de l'invention sont présentés respectivement dans les tableaux 5 et 6, ci-après, la thrombine étant utilisée à 20 uNIH/ml (uNIH - National Institute Health - : quantité de
- 15 fraction coagulante de thrombine nécessaire pour coaguler en 15 s une solution de fibrinogène à 2%/00 tamponnée à 7,4, sous un volume final de 1 ml à 37°C).

Tableau 5

TT et concentration en thrombine inactivée en fonction de la concentration en héparine (µg/ml)

20

25	HEPARINE (µg/ml)	0	0,23	0,58	1,16	2,9	5,78	11,56	15	30
	TT (en secondes)	5,3	6	6,5	7	10	35	94,5	∞	∞
30	T. inactivée uNIH/ml	-	2,143	3,34	5,3	10	16,25	19	20	20

Tableau 6

TT et concentration en thrombine inactivée en fonction  
de la concentration en glycopeptide de l'invention  
5 ( $\mu\text{g/ml}$ )

GLYCOPEPTIDE DE L'INVENTION											
(µg/ml)		0	5	10	20	30	50	70	90	100	110
10	TT (en secondes)	5,3	5,25	5,8	6,5	8,5	13	28	89,3	∞	∞
15	T. inactivée uNIH/ml	-	-	1,49	3,34	8,1	12,31	17	19	20	20

Etude du temps de thrombine (TT) à différentes  
20 concentrations de thrombine.

Le temps de coagulation à différentes concen-  
trations de thrombine permet en traçant la courbe de TT  
(Temps de thrombine en seconde) en fonctions de  $1/T$   
(l'inverse de la concentration en thrombine  $(\text{uNIH/ml})^{-1}$ )  
25 de déterminer la concentration en thrombine inactivée  
connaissant la concentration en thrombine initiale pour  
chaque temps de coagulation.

Le tableau 7, ci-après, correspond au temps de  
thrombine (TT) mesuré sur plasma à différentes concen-  
30 trations de thrombine.

Tableau 7

TT mesuré sur plasma à différentes concentrations de  
thrombine

5

10	Concentration en T. (uNIH/ml)	5	10	15	20	30
	I/T (uNIH) <sup>-1</sup>	0,2	0,1	0,066	0,05	0,033
15	T.T. (en secondes)	19,5	10	7,5	5,3	4,5

Le tableau 8, ci-après, représente le temps de  
coagulation mesuré sur fibrinogène à différentes concen-  
trations de thrombine.

Tableau 8

25	concentration en T. (uNIH/ml)	5	7,5	10	15	20
30	$\frac{1}{T}$ (uNIH/ml) <sup>-1</sup>	0,2	0,133	0,1	0,066	0,05
	temps de coagulation (secondes)	49,2	31	23,5	15,9	12,5

35

En prenant comme critère la concentration d'héparine ou de glycopeptide de l'invention nécessaire à l'inactivation de la moitié de la quantité de thrombine ajoutée au milieu réactionnel, on constate que :

- 5           - 1 mg d'héparine inactive 3 125 uNIH de thrombine environ, 1 mg de glycopeptide de l'invention inactif 278 uNIH environ, ce qui permet de constater que l'activité anti IIa du glycopeptide de l'invention dans le plasma est donc de 15,4 UI/mg environ ce qui  
10 correspond à environ 9 % de l'activité héparinique à ce niveau.

### 3-1 Temps de thrombine (TT) sur fibrinogène

Un allongement du temps de thrombine sur fibrinogène s'explique soit par une altération du fibrinogène  
15 soit par une inactivation de la thrombine indépendante de l'antithrombine III.

#### Résultats :

La thrombine est utilisée à 20 uNIH/ml et l'héparine CHOAY sert de référence.

- 20           a) Inactivation de la thrombine par l'héparine.  
Les résultats sont rassemblés au tableau 9 ci-après.

**Tableau 9**

25   Activité antithrombique de l'héparine mesurée sur fibrinogène dans un milieu dépourvu d'antithrombine III

30	HEPARINE (ug/ml)	0	0,23	0,58	0,87	1,16	2,9	5,78	11,56	28,9	57,8
	T.T. (secondes)	12,5	13	13,7	14,5	15,2	16,6	22,9	39	121,8	∞
	THROMBINE INACTIVEE (uNIH/ml)	0	0,77	1,82	3,05	3,88	5,3	9,37	13,75	18	20

b) Inactivation de la thrombine par le glycopeptide de l'invention. Les résultats sont rassemblés au tableau 10 ci-après.

Tableau 10

5

Activité antithrombique du glycopeptide de l'invention évaluée sur fibrinogène dans un milieu dépourvu d'antithrombique III

10

	glycopeptide (µg/ml) de l'invention	0	5	10	20	25	50	70
15	T.T. (en secondes)	11,9	13	16	23,6	30	101	∞
20	THROMBINE INACTIVEE (uNIH/ml)	0	2,76	5,72	10	12,07	17,6	20

Comme précédemment, le critère d'évaluation quantitative de l'activité anti IIa est la quantité d'anticoagulant nécessaire à l'inhibition de 50 % de la thrombine ajoutée au milieu réactionnel.

Ainsi :

- 1 mg d'héparine inhibe 1 538 uNIH de thrombine,

- 1 mg de glycopeptide de l'invention inhibe 500 uNIH de thrombine, ce qui correspond à environ 32 % de l'activité héparinique constatée.

#### ACTIVITE ANTI Xa

a) Inactivation du Xa par l'héparine. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 11 ci-après.

Tableau 11

Temps de (Xa) à des concentrations variables en héparine

5	HEPARINE ( $\mu\text{g/ml}$ )	0	0,115	0,230	0,578	1,156	2,89
	temps de coagulation (secondes)	11	12,2	13,7	21,7	36,9	82,5
10	$\log_t$	1,041	1,086	1,137	1,336	1,567	1,916

15            b) Inactivation du Xa par le glycopeptide de l'invention. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 12 ci-après.

Tableau 12

20 Temps de Xa à des concentrations variables en glycopeptide de l'invention

25

glycopeptide de l'invention							
( $\mu\text{g/ml}$ )	0	2	4	8	12	16	20
temps de coagulation (secondes)	11	11	12	16,1	19,8	29	37,2
$\log_t$	1,041	1,041	1,079	1,21	1,3	1,463	1,57

30

35 Les courbes correspondantes représentent le logarithme du temps de coagulation ( $\log t$ ) en fonction

de la concentration en glycopeptide de l'invention ou en héparine. Pour un même temps de coagulation (22s) choisi comme étant le double du temps témoin, les concentrations respectives d'héparine et de glycopeptide de l'invention nécessaire pour avoir le même effet anticoagulant sont respectivement 0,833  $\mu\text{g/ml}$  et 11,83  $\mu\text{g/ml}$ .

L'héparine CHOAY possède 173 UI/mg, par conséquent, et se rapportant à cette activité référence, le glycopeptide de l'invention évaluée pour son activité anti Xa possède : 12 UI/mg. Donc le glycopeptide de l'invention possède 7 % de l'activité héparinique au niveau du facteur Xa.

Le temps de reptilase concernant respectivement l'héparine et le glycopeptide de l'invention est indiqué dans les tableaux 13 et 14 ci-après :

Tableau 13

Hep. (UI/ml)	0	2	5	10
Temps de coag. (sec)	58,8	59	50,4	45,4

Tableau 14

glycopeptide de l'invention					
( $\mu\text{g/ml}$ )	0	50	100	200	320
Temps de coag. (sec)	58	36	49,6	40,4	50

La reptilase n'est pas sensible à l'héparine. L'héparine n'inhibe la polymérisation de fibrinogène que par l'intermédiaire de la thrombine. Le glycopeptide de l'invention évaluée à différente concentration ne provoque aucun allongement du temps de reptilase. Ceci est en faveur d'une activité anticoagulante ne mettant pas en jeu une dégradation ou une altération quelconque du fibrinogène par le glycopeptide de l'invention, son effet antipolymérisant s'exerçant surtout par une inhibition directe de la thrombine. Ceci est mis en évidence par le temps de fibrinogène dans un milieu non plasmatique et en absence d'anti-T III.

#### Conclusion

Les résultats présentés ci-dessus montrent que les mécanismes d'action de l'héparine et du glycopeptide de l'invention pour les facteurs étudiés sont différents, le glycopeptide de l'invention ayant comparative-ment une activité antithrombique directe plus importante que son activité catalytique. Le glycopeptide de l'invention, comme l'héparine, présente une totale innocuité vis-à-vis du fibrinogène.

Le tableau 15 ci-après est un tableau comparatif des propriétés de l'héparine et du glycopeptide de l'invention.

30

35



5  
10  
15  
20  
25  
30  
35

TABLEAU 15  
TABLEAU RECAPITULATIF DE COMPARAISON ENTRE  
LA MYXALINE ET L'HEPARINE

1- ACTIVITE ANTITHROMBIQUE	MYXALINE	HEPARINE	MYXALINE/HEPARINE
	15 4 UI/mg	173 UI/mg	9 %
Milieu plasmatique	278 uNIH/mg	3125 uNIH/mg	
Sur fibrinogène	500 uNIH/mg	1538 uNIH/mg	32 %
2- ACTIVITE ANTI Xa	12 8 UantiXa/mg	173 UantiXa/mg	7 %

### 3- TEMPS DE CEPHALINE

KAOLIN

Double du temps Témoin  
Temps  
Héparine 42 fois plus active que la Myxaline  
Héparine 16 fois plus active que la Myxaline

### 4- TEMPS DE QUICK

Double du temps Témoin  
Temps  
Héparine 2 7 fois plus active que la Myxaline  
Héparine 2 7 fois plus active que la Myxaline

L'invention vise également toute composition contenant le glycopeptide selon l'invention, notamment toute composition présentant des propriétés anticoagulantes et contenant le glycopeptide selon l'invention.

L'invention vise plus particulièrement les compositions contenant le glycopeptide selon l'invention, lesquelles compositions ont les propriétés suivantes

- leur poids moléculaire est compris d'environ 5 000 à environ 30 000, notamment à environ 20 000 ;
- elles contiennent d'environ 50 à environ 55 % (en poids) d'acides aminés, d'environ 5 à environ 10 % (en poids) de motifs sucres et d'environ 0 à environ 4 % (en poids) de lipides ;
- les motifs sucres contenus sont des hexoses et des hexoses aminés, appartenant au groupe constitué par la mannose, le glucose, le galactose, la galactosamine, la glucosamine ;
- leur comportement en chromatographie HPLC n'est pas modifié par le sodium dodécylsulfate ;
- elles sont anticoagulantes sur sang total à partir d'une concentration d'environ 1 600 µg/ml ;
- leur activité anticoagulante est d'environ 0,1 à environ 0,15 UI/mg ;
- elles entraînent un allongement du temps de Quick ;
- elles entraînent un allongement du temps de thrombine ;
- elles inactivent le facteur Xa.

Un exemple de composition contenant le glycopeptide de l'invention peut être tel que la fraction sucre contienne environ 30 à environ 40 %, notamment environ 36 % (en poids) de mannose, environ 20 % à environ 30 %, notamment 26 % (en poids) de glucose, environ 15 à environ 25 %, notamment environ 18 % (en

5 poids) de galactose, environ 5 à environ 15 % , notamment 8 % (en poids) de galactosamine, environ 5 à environ 15 %, notamment environ 10 % (en poids) de glucosamine.

Les résidus acides aminés peuvent être dosés par la méthode de Lowry.

10 Les sucres peuvent être dosés par la méthode à l'anthrone.

L'invention vise en particulier les compositions du type de l'extrait brut mentionné ci-dessus.

15 L'invention concerne en particulier les compositions dénommées ci-après extraits bruts, susceptibles d'être obtenues par la mise en oeuvre du procédé comprenant les étapes suivantes :

- la séparation et la récupération du surnageant provenant d'un milieu de culture de myxobactéries du sous-ordre des cystobacterinae ou de mutantes de celles-ci ;

20 - l'élimination à partir du surnageant ainsi récupéré des substances de poids moléculaires inférieurs à environ 1 000 daltons ;

- l'élimination à partir du surnageant des protéines ;

25 - l'élimination à partir du surnageant des substances insolubles dans l'eau.

30 L'ordre dans lequel les trois étapes relatives respectivement à l'élimination des substances de poids moléculaires inférieurs à environ 1 000, des protéines et des produits insolubles dans l'eau n'intervient pas.

35 La matière première à partir de laquelle le glycopeptide de l'invention peut être obtenu peut être constituée par le surnageant provenant d'un milieu de culture de myxobactéries, du sous-ordre des Cystobacterinae ou de mutants de celles-ci.

Les sous-bacterinae se distinguent par le fait

qu'elles produisent un mucus qui absorbe le rouge Congo.

Le milieu de culture de ces Cystobacterinae peut être constitué par un milieu solide ou liquide.

5 On a de préférence recours à un milieu de culture liquide.

La souche de myxobactéries utilisée est avantageusement constituée par une souche de *Myxococcus xanthus*.

10 La souche utilisée est par exemple la Myxococcus xanthus CM011, qui dérive de la souche I448, déposée le 3 mai 1985, par l'insertion (n° 11) d'un transposon Tn5 (selon la technique décrite dans "Introduction of transposon Tn5 into *Myxococcus* for analysis of developmental and other non selectable mutants", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 425-429.

Cette insertion confère à la souche la capacité de produire 50 % de plus de sucres dans le milieu que la souche d'origine.

20 A titre d'exemple, on peut également utiliser la souche DK1622, telle que décrite dans Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 5 952-5 956, 1979.

Une telle souche est cultivée en milieu liquide, agité, constitué de Casitone Difco tamponné.

25 En ce qui concerne la séparation du surnageant, on prélève celui-ci de préférence au début de la phase stationnaire de croissance, en d'autres termes, à la fin de la phase exponentielle de croissance.

30 On a de préférence recours dans une première étape, à l'élimination des protéines, puis à l'élimination des substances de poids moléculaires inférieurs à environ 1 000 daltons, puis à l'élimination des substances insolubles dans l'eau.

35 L'élimination des protéines peut avoir lieu en utilisant du phénol.

Le phénol permet de faire précipiter les protéines et la phase aqueuse contient les compositions selon l'invention.

5 Le phénol utilisé est avantageusement du phénol 50 % (poids/volume).

L'élimination des protéines peut également avoir lieu par filtration sur membrane, par exemple sur membrane de 10 000 daltons, notamment membrane de la marque  
10 AMICON 30D commercialisée par AMICON.

L'élimination des substances de poids moléculaires inférieurs à environ 1 000 peut être effectuée en utilisant de l'alcool éthylique pur.

15 L'addition d'alcool précipite les substances de poids moléculaires supérieurs à environ 1 000, tandis que les substances de poids moléculaires inférieurs à environ 1 000, se retrouvent dans l'alcool.

La phase de traitement à l'alcool a également pour but de concentrer.

20 Le précipité obtenu grâce à l'alcool peut être resolubilisé dans l'eau, la phase aqueuse obtenue étant retraitée par une nouvelle addition d'alcool, si l'on désire concentrer davantage.

25 On peut ensuite laver le précipité obtenu ci-dessus à l'acétone, pour délipider partiellement, puis à l'éther, notamment pour sécher.

On redissout le précipité dans de l'eau distillée.

30 L'élimination des produits insolubles peut être effectuée par centrifugation du précipité redissout.

Puis, on a avantageusement recours à un traitement de purification pour éliminer l'alcool ainsi que l'acétone et l'éther éventuellement utilisés dans les étapes précédentes.

35 Ce traitement de purification est avantageusement constitué par une ultrafiltration sur membrane,

notamment 1 000 daltons ; cette étape d'ultrafiltration est aussi une étape de concentration.

5 Cette étape de purification est avantageusement suivie d'une phase de concentration, par exemple sur membrane.

En ce qui concerne la phase d'élimination des insolubles, elle peut également avoir lieu après l'étape de purification et de concentration mentionnée ci-dessus.

Le produit brut selon l'invention peut notamment être conservé après lyophilisation ou évaporation sous vide.

15 Selon un mode de réalisation préféré, le procédé de l'invention comprend :

- la récupération du surnageant provenant d'un milieu de culture de myxobactéries appartenant au groupe produisant un mucus colorable au rouge congo, laquelle culture est au début de la phase stationnaire de croissance,

20 - l'addition au surnageant de phénol à 50 % (poids/volume), ce qui conduit à l'obtention d'une phase aqueuse contenant la composition de l'invention et un précipité contenant les protéines ;

25 - la séparation des phases et la récupération de la phase aqueuse qui contient la composition selon l'invention,

30 - l'addition d'alcool à la phase aqueuse débarrassée des protéines, ce qui conduit à l'obtention d'un précipité qui contient la composition selon l'invention, débarrassé des substances de poids moléculaires inférieurs à environ 1 000 daltons ;

35 - le lavage du susdit précipité à l'acétone, puis à l'éther, puis le séchage,

- l'élimination des insolubles dans l'eau par

dissolution du précipité obtenu ci-dessus, puis centrifugation,

- 5       - la purification et la concentration de la phase obtenue ci-dessus par ultrafiltration,
- la conservation de l'extrait brut par lyophilisation ou évaporation sous vide.

10       Selon un mode de réalisation avantageux, le procédé d'obtention des glycopeptides et des glycoprotéines de l'invention comprend en outre une étape dans laquelle on traite le surnageant afin d'éliminer les protéases, notamment par chauffage à environ 100°C, pendant un temps suffisant, par exemple environ 2 à environ 5 mn.

15       On donne ci-après le protocole détaillé de l'obtention d'une composition selon l'invention contenant le glycopeptide selon l'invention.

20       On prend la culture en début de phase stationnaire de croissance et on centrifuge à 8 000 g pendant 15 à 30 minutes pour éliminer les bactéries et récupérer le surnageant du milieu de culture.

      On ajoute au surnageant un volume de phénol à 50 % (poids/volume) dans l'eau distillée.

25       On agite énergiquement et on laisse agir à 60°C pendant 5 minutes.

      On refroidit directement à 0°C dans un mélange réfrigérant (glace + eau) et on laisse reposer pour séparer la phase aqueuse du précipité qui s'est formé suite à l'addition de phénol.

30       On prélève la phase aqueuse qui contient la composition de l'invention, on centrifuge à 1 500 g à 0°C pendant 2 à 3 minutes et on récupère la phase aqueuse.

35       On effectue un second traitement au phénol 50 %.

      On précipite la composition de l'invention de la phase aqueuse en la traitant avec 5 volumes d'alcool 95°

à -20°C pendant une nuit, ce qui permet ainsi d'éliminer le phénol et de concentrer.

5 On centrifuge à 3 000 g et à 0°C pendant 15 à 30 minutes.

On resuspend le précipité obtenu ci-dessus dans un petit volume d'eau distillée et on reprécipite avec 3 volumes d'alcool 95° à -20°C (comme précédemment), ce qui permet encore d'éliminer le phénol et de concentrer.

10 On lave à l'acétone, ce qui permet notamment de délipider partiellement, d'éliminer le phénol restant éventuellement, puis à l'éther, ce qui permet d'éliminer le phénol restant éventuellement (à -20°C) et on laisse sécher sur une pailleasse à flux laminaire.

15 On redissout dans l'eau distillée.

On élimine les substances insolubles dans l'eau par centrifugation pendant 4-5 minutes à 160 g.

( On lave les substances insolubles avec de l'eau distillée et on centrifuge comme précédemment.

20 On ultrafiltre notamment sur une membrane Amicon 1000D pour éliminer notamment l'alcool, l'acétone, l'éther et pour concentrer. On obtient la composition selon l'invention que l'on peut lyophiliser pour conserver.

25 En ce qui concerne les cellules utilisées, elles sont cultivées en milieu liquide (10 g/l de Bactocasitone commercialisé par Difco ; 8 mM  $\text{SO}_4\text{Mg}$  ; Tris pH 7,6 10 mM ; tampon phosphate pH 7,6 1 mM) à 30°C sous forte aération (agitation rotative à 300 rpm en erlen ou fermenteur de 7 l).

30 Selon un autre mode de réalisation préféré, le procédé d'obtention des compositions de l'invention correspond au procédé décrit ci-dessus dans lequel on remplace l'étape phénolique par une déprotéinisation partielle par ultrafiltration.

35



Résultats biologiques de la composition de l'invention  
obtenue par le procédé comportant la précipitation à  
l'aide de phénol

On donne ci-après les résultats biologiques de la composition de l'invention obtenue par le procédé ci-dessus décrit dans lequel on a recours à la précipitation à l'aide de phénol.

1° Coagulation sur sang total

Elle est effectuée selon le protocole indiqué à propos du glycopeptide. La concentration à partir de laquelle la composition obtenue par le procédé comportant la précipitation à l'aide de phénol est anticoagulante est de 1 600 µg/ml.

2° APTT ou temps de céphaline-kaolin

Les résultats relatifs au temps de céphaline-kaolin sont rassemblés dans le tableau 16 ci-après qui exprime le temps de céphaline-kaolin (en secondes) en fonction des concentrations différentes de la composition de l'invention (en µg/ml).

TABLEAU 16

Témoin (tampon de Michaelis)	Concentration de la composition dans le tampon (µg/ml)	Moyenne des temps de coagulation en secondes		
		44,7	- 46	- 45
600		35,2		
1 000		19		
1 500		10		

Les résultats du tableau montrent qu'il y a réduction du temps de céphaline-kaolin.

### 3° Temps de quick

Les résultats sont donnés dans le tableau 17 dans lequel on a exprimé le temps de Quick pour des concentrations variables de la composition de l'invention.

TABLEAU 17

10	Témoin (tampon de Michaelis)	:	Moyenne des temps de coagulation en secondes
	Concentration de la composition dans le tampon ( $\mu\text{g/ml}$ )	:	-----
		:	14,1 - 14,2 - 14
15	600	:	13,9
	1 000	:	16,6
	1 500	:	17,7

20 L'amélioration de la voie exogène montre que la composition de l'invention rallonge le temps de Quick et que cet effet est proportionnel à la concentration.

### 4° Temps de Xa

25 Les résultats concernant le temps de Xa sont rassemblés dans le tableau 18 ci-après qui exprime le temps de Xa pour des concentrations variables en composition de l'invention.

30

35

TABLEAU 18

5	Témoin (tampon de Michaelis)	:	Moyenne des temps de coagulation en secondes
	Concentration de la composition ( $\mu\text{g/ml}$ )	:	18,1 - 17,9 - 18
10	600	:	19,8
	1 000	:	23,6
	1 500	:	33,3

15

D'après ce tableau, il résulte que la composition selon l'invention prolonge le temps de coagulation en inactivant le facteur Xa. Ainsi 1 000  $\mu\text{g/ml}$  de composition inactivent 3,5 nanounités catalytiques de Xa.

#### 20 5. Test de cytotoxicité

Ce test a été effectué in vitro sur des fibroblastes de poumons d'embryon de poulet à 14 jours d'incubation.

Le milieu de culture utilisé est le BME (base-médium-Eagel) contenant 2 % de tricine, 2 % de bicarbonate de sodium, et 10 % de sérum de veau foetal (Eurobio).

Pour effectuer ce test, on utilise des boîtes de cultures Nunc (commercialisées par Polylabo) à 4 cupules.

Dans chaque cupule, on introduit le même nombre de cellules (environ 20 000 cellules/ml de milieu BME).

On incube à 37°C pendant 24 heures.

On rince doucement 2 ou 3 fois la culture avec le même milieu.

Dans deux cupules prises comme témoins, on introduit 1 ml de BME et dans les deux autres la composition de l'invention dissoute dans le même volume de milieu.

Différentes concentrations de polysaccharide ont été essayées : 20, 40, 60, 80 et 100 µg Geq/ml de BME, 1 µg Geq/ml représentant la quantité d'hexose de l'extrait.

Le comportement des cellules en présence du produit, en comparaison avec le témoin, suivi en microcinéma-vidéo à la température de 37°C (chambre de prise de vue thermostatée) a permis de montrer qu'aucun signe de cytotoxicité n'était constaté.

L'invention concerne également les compositions pharmaceutiques associant les susdits glycopeptides de l'invention et susdites compositions les contenant, avec un véhicule pharmaceutique.

Les glycopeptides de l'invention et les compositions les contenant sont particulièrement adaptés au contrôle (préventif ou curatif) de la coagulation sanguine chez l'homme ou l'animal, notamment dans ceux des cas où l'hôte est soumis à des risques d'hypercoagulabilité, plus particulièrement ceux résultant d'une perturbation de la phase extrinsèque susdite, par exemple comme conséquence d'une libération par l'organisme de thromboplastine, par exemple de thromboplastine tissulaire (interventions chirurgicales, processus athéromateux, développement de tumeurs, perturbations des mécanismes de la coagulation par des activateurs bactériens ou enzymatiques, etc.).

Les glycopeptides de l'invention et les compositions les contenant peuvent être sous forme de préparations administrables par voie orale ou rectale, en utilisant des solides ou des liquides appropriés pour un tel type d'administration ou sous forme de préparations

injectables stériles contenant au moins l'une quelconque des compositions selon l'invention, en association avec des véhicules liquides appropriés stériles, de préférence isotoniques.

D'autres formes appropriées de préparations consistant en pommades dans lesquelles les glycopeptides selon l'invention et les compositions les contenant sont associés avec des véhicules en pommade.

On notera que les doses auxquelles les glycopeptides de l'invention et les compositions les contenant sont utilisés sont déterminées selon la nature de la maladie qui afflige le patient et les conditions particulières de santé.

les dosages appropriés sont déterminés par le médecin, comme la pratique l'exige dans ces domaines d'application.

L'invention concerne également encore l'application des compositions selon l'invention à la constitution de réactifs biologiques utilisables au laboratoire, notamment à titre de référence de comparaison pour l'étude d'autres produits dont est testée l'activité anticoagulante.

REVENDEICATIONS

1. Glycopeptides et glycoprotéines caractérisés par les propriétés suivantes :

- 5       - leur poids moléculaire est compris d'environ 5 000 à environ 20 000 daltons, notamment d'environ 5 000 à environ 10 000 ;
- les motifs sucres contenus sont des hexoses et des hexoses aminés, appartenant au groupe constitué par  
10      le mannose, le glucose, le galactose, la galactosamine, la glucosamine ;
- leur comportement en chromatographie HPLC n'est pas modifié par le sodium dodécylsulfate ;
- leur pH isoélectrique est d'environ 3 à envi-  
15      ron 5, notamment d'environ 3,6 ;
- ils sont anticoagulants sur sang total à partir d'une concentration d'environ 80 µg/ml ;
- leur activité anticoagulante est d'environ 2 à  
20      environ 10 UI/mg ;
- ils entraînent un allongement du temps de céphaline-kaolin ;
- ils entraînent un allongement du temps de Quick ;
- 25      - ils entraînent un allongement du temps de thrombine ;
- ils inactivent le facteur Xa.

2. Glycopeptides selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'ils ont un poids moléculaire d'environ 6 300 daltons.

30      3. Glycopeptides et glycoprotéines selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'ils ont la composition suivante :

- environ 70-80 % (en poids) de résidus d'acides  
35      aminés ;
- environ 30-20 % (en poids) de motifs sucres, lesquels motifs sucres sont constitués par environ 60 à

environ 65 % (en poids) de sucres neutres et environ 35 à environ 40 % (en poids) d'osamines.

5 4. Glycopeptides et glycoprotéines selon les revendications 1 à 2, caractérisés en ce que :

- la composition des motifs sucres neutres est constituée par environ 30 à 35 % (en poids) de glucose, environ 15 à environ 20 % (en poids) de mannose, environ 10 à environ 15 % (en poids) de galactose ;

10 - la composition des osamines est constituée d'environ 20 à environ 25 % (en poids) de glucosamine et d'environ 10 à environ 15 % (en poids) de galactosamine.

15 5. Glycopeptides et glycoprotéines selon la revendication 3, caractérisés en ce que la composition en sucres est

- environ 35 % (en poids) de glucose,  
- environ 11,4 % (en poids) de galactose,  
- environ 16,3 % (en poids) de mannose,  
20 - environ 23,3 % (en poids) de glucosamine et  
- environ 14 % (en poids) de galactosamine.

6. Glycopeptides et glycoprotéines selon les revendications 1 à 3, caractérisés en ce que la composition en acides aminés est la suivante :

25 - environ 30 à environ 35 % (en poids) d'acide glutamique ;

- environ 25 à environ 30 % (en poids) de sérine ;

30 - environ 5 à environ 10 % (en poids) d'acide aspartique ;

- environ 5 à environ 10 % (en poids) de glycine ;

- environ 5 à environ 10 % (en poids) d'isoleucine ;

35 - environ 5 à environ 10 % (en poids) d'alanine ;

- environ 0 à environ 5 % (en poids) de valine ;

- environ 0 à environ 5 % (en poids) de leucine ;
- 5       - environ 0 à environ 5 % (en poids) de thréonine ;
- environ 0 à environ 5 % (en poids) de tyrosine ;
- moins d'environ 2 % (en poids) de proline ;
- 10       - moins d'environ 2 % (en poids) de lysine ;
- moins d'environ 2 % (en poids) de phénylalanine ;
- moins d'environ 2 % (en poids) d'histidine ;
- moins d'environ 2 % (en poids) d'arginine.
- 15       7. Glycopeptides et glycoprotéines selon la revendication 5, caractérisés en ce que la composition en acides aminés est la suivante :
  - environ 31 % (en poids) d'acide glutamique,
  - environ 28 % (en poids) de sérine,
  - 20       - environ 7 % (en poids) d'acide aspartique,
  - environ 6 % (en poids) de glycine,
  - environ 5,5 % (en poids) d'isoleucine,
  - environ 5 % (en poids) d'alanine,
  - environ 3 % (en poids) de valine,
  - environ 3 % de (en poids) leucine,
  - 25       - environ 2,5 % (en poids) de thréonine,
  - environ 2,5 % (en poids) de tyrosine,
  - moins d'environ 2 % (en poids) de proline,
  - moins d'environ 2 % (en poids) de phénylalanine,
  - 30       - moins d'environ 2 % (en poids) d'histidine,
  - moins d'environ 2 % (en poids) d'arginine.
- 35       8. Glycopeptides et glycoprotéines caractérisés en ce qu'ils sont obtenus par le procédé caractérisé par :
  - la séparation et la récupération du surnageant provenant d'un milieu de culture de myxobactéries du sous-ordre des Cystobacterinae ou de mutants de



celles-ci ;

5       - l'élimination à partir du surnageant des substances de poids moléculaires inférieurs à environ 1 000 daltons ;

      - l'élimination à partir du surnageant des substances insolubles dans l'eau ;

10       - et la récupération de la fraction du surnageant débarrassée des substances de poids moléculaires inférieurs à environ 1 000 daltons et débarrassée des substances insolubles dans l'eau ;

      - la purification de cette fraction par chromatographie sur colonne de pseudo-affinité ;

15       - la purification subséquente de la susdite fraction par chromatographie sur colonne de gel de polymère réticulé de dextrane, notamment de gel com-commercialisé sous le nom de Sephadex.

20       9. Glycopeptides et glycoprotéines caractérisés en ce qu'il sont obtenus par le procédé selon la revendication 7, dans lequel on traite le surnageant afin d'éliminer les protéases, par chauffage à environ 100°C, pendant environ 2 à environ 5mn.

25       10. Glycopeptides et glycoprotéines selon la revendication 7, caractérisés en ce que la souche utilisée est une souche de Myxococcus xanthus ou un mutant de celle-ci.

30       11. Glycopeptides et glycoprotéines selon la revendication 7, caractérisés en ce que la souche est la souche Myxococcus xanthus CMO11, qui dérive de la souche déposée à la CNCM sous le numéro I448, par l'insertion d'un transposon Tn5.

35       12. Glycopeptides et glycoprotéines selon la revendication 7, caractérisés en ce qu'ils sont obtenus par le procédé comprenant:

      - la séparation du surnageant provenant d'un milieu de culture de myxobactéries du sous-ordre des

Cystobacterinae ou de mutants de celles-ci, laquelle culture est au début de la phase stationnaire de croissance ;

5           - l'addition d'alcool au susdit surnageant, ce qui conduit à l'obtention d'un précipité qui contient les glycopeptides selon l'invention et qui est débarrassé des substances de poids moléculaires inférieurs à environ 1 000 daltons ;

10           - le lavage du susdit précipité à l'acétone, puis à l'éther, puis le séchage du précipité ;

          - la dissolution dans l'eau distillée du susdit précipité séché ;

15           - l'élimination des substances insolubles dans l'eau, notamment par centrifugation et l'obtention d'une solution contenant les glycopeptides de l'invention et débarrassée des substances de poids moléculaires inférieurs à environ 1 000 daltons, et des substances insolubles dans l'eau ;

20           - la purification par ultrafiltration et la concentration de la solution obtenue ci-dessus, ce qui conduit à l'obtention d'une fraction contenant les glycopeptides ;

25           - la conservation de la susdite fraction par lyophilisation ou évaporation sous vide ;

          - la purification par chromatographie sur colonne de pseudo-affinité de la susdite fraction ;

30           - la purification subséquente par chromatographie sur colonne de gel de polymère réticulé de dextrane, notamment de gel commercialisé sous le nom Sephadex.

13. Glycopeptides et glycoprotéines selon la revendication 7, caractérisés par le procédé comprenant :

35           - la séparation et la récupération du surnageant provenant d'un milieu de cultures de myxobactéries du

sous-ordre des Cystobacterinae ou de mutants de celles-ci ;

5       - l'élimination à partir du surnageant ainsi récupéré :

      . des protéines,

      . des substances de poids moléculaires inférieurs à environ 1 000 daltons,

10       . des substances insolubles dans l'eau ;  
pour donner un extrait brut ;

      - la purification par chromatographie sur colonne de pseudo-affinité du susdit extrait brut ;

      - la purification subséquente par chromatographie sur colonne de gel de polymère réticulé de dextrane, notamment de gel commercialisé sous le nom Sephadex.

15       14. Glycopeptides et glycoprotéines selon la revendication 12, caractérisés par le procédé comprenant :

20       - la séparation et la récupération du surnageant provenant d'un milieu de cultures de myxobactéries appartenant au groupe produisant un mucus colorable au rouge Congo, laquelle culture est au début de la phase stationnaire de croissance ;

25       - l'addition au surnageant de phénol à 50 % (poids/volume), qui conduit à :

      . l'obtention d'un précipité contenant les protéines ;

      . et à l'obtention d'une phase aqueuse contenant les glycopeptides selon l'invention ;

30       - la séparation des phases et la récupération de la phase aqueuse qui contient les glycopeptides selon l'invention ;

35       - l'addition d'alcool à la susdite phase aqueuse ce qui conduit à l'obtention d'un précipité qui contient les glycopeptides selon l'invention et qui est débarrassé des protéines et des substances de poids moléculaires

inférieurs à environ 1 000 daltons ;

- le lavage du susdit précipité à l'acétone, puis à l'éther, puis le séchage du précipité ;

5 - la dissolution dans l'eau distillée du susdit précipité séché ;

10 - l'élimination des substances insolubles dans l'eau, notamment par centrifugation et l'obtention d'une solution contenant les glycopeptides de l'invention et débarrassée des substances de poids moléculaires inférieurs à environ 1 000 daltons, des protéines et des substances insolubles dans l'eau ;

15 - la purification par ultrafiltration et la concentration de la solution obtenue ci-dessus, ce qui conduit à l'obtention d'un extrait brut contenant les glycopeptides ;

- la conservation du susdit extrait brut par lyophilisation ou évaporation sous vide ;

20 - la purification par chromatographie sur colonne de pseudo-affinité de l'extrait brut ;

- la purification subséquente par chromatographie sur colonne de gel de polymère réticulé de dextrane, notamment de gel de Sephadex.

25 15. Glycopeptidique caractérisé en ce qu'il est obtenu par le procédé selon la revendication 7, dans lequel on traite le surnageant afin d'éliminer les protéases, notamment par chauffage à environ 100°C, pendant environ 2 à environ 5mn.

30 16. Composition caractérisée en ce qu'elle contient les glycopeptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 14.

17. Composition selon la revendication 15, caractérisée par les propriétés suivantes :

35 - son poids moléculaire est compris d'environ 5 000 à environ 30 000, notamment à environ 20 000 ;

- elle contient d'environ 50 à environ 55 % (en

poids) d'acides aminés, d'environ 5 à environ 10 % (en poids) de motifs sucres et d'environ 3 à environ 4 % (en poids) de lipides ;

5       - les motifs sucres contenus sont des hexoses et des hexoses aminés, appartenant au groupe constitué par la mannose, le glucose, le galactose, la galactosamine, la glucosamine ;

10       - son comportement en chromatographie HPLC n'est pas modifié par le sodium dodécylsulfate ;

      - elle est anticoagulante sur sang total à partir d'une concentration d'environ 1 600 µg/ml ;

      - son activité anticoagulante est d'environ 0,1 à 0,15 UI/mg ;

15       - elle entraîne un allongement du temps de Quick ;

      - elle entraîne un allongement du temps de thrombine ;

20       - elle inactive le facteur Xa.

20       18. Composition selon la revendication 15, caractérisée en ce que la composition en motifs sucres est constituée par environ 30 à environ 40 %, notamment environ 36 % (en poids) de mannose, environ 20 % à environ 30 %, notamment 26 % (en poids) de glucose, 25       environ 15 à environ 25 %, notamment environ 18 % (en poids) de galactose, environ 5 à environ 15 %, notamment 8 % (en poids) de galactosamine, environ 5 à environ 15 %, notamment environ 10 % (en poids) de glucosamine.

30       19. Composition selon la revendication 17, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par le procédé comprenant les étapes suivantes :

      - la récupération du surnageant provenant d'un milieu de culture de myxobactéries appartenant au groupe 35       produisant un mucus colorable au rouge congo, laquelle culture est au début de la phase stationnaire de

croissance,

5       - l'addition au surnageant de phénol à 50 %  
(poids/volume), ce qui conduit à l'obtention d'une phase  
aqueuse contenant la composition de l'invention et un  
précipité contenant les protéines ;

      - la séparation des phases et la récupération de  
la phase aqueuse qui contient la composition selon l'in-  
vention,

10       - l'addition d'alcool à la phase aqueuse débar-  
rassée des protéines, ce qui conduit à l'obtention d'un  
précipité qui contient la composition selon l'invention,  
débarrassé des substances de poids moléculaires  
inférieurs à environ 1 000 daltons ;

15       - le lavage du susdit précipité à l'acétone,  
puis à l'éther, puis le séchage,

      - l'élimination des insolubles dans l'eau par  
dissolution du précipité obtenu ci-dessus, puis centri-  
fugation,

20       - la purification et la concentration de la  
phase obtenue ci-dessus par ultrafiltration,

      - la conservation de l'extrait brut par lyo-  
philisation ou évaporation sous vide.

25       20. Composition caractérisée en ce qu'elle est  
obtenue par le procédé selon la revendication 18, dans  
lequel on traite le surnageant afin d'éliminer les pro-  
téases notamment par chauffage à environ 100°C, pendant  
environ 2 à environ 5mn.

30

35

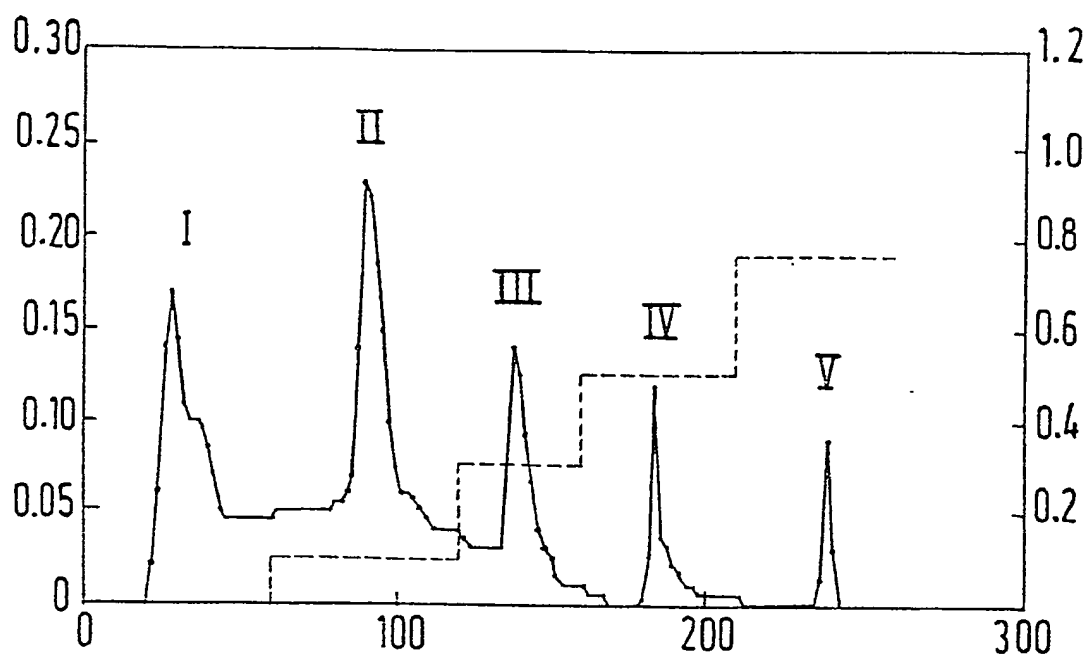


FIG. 1

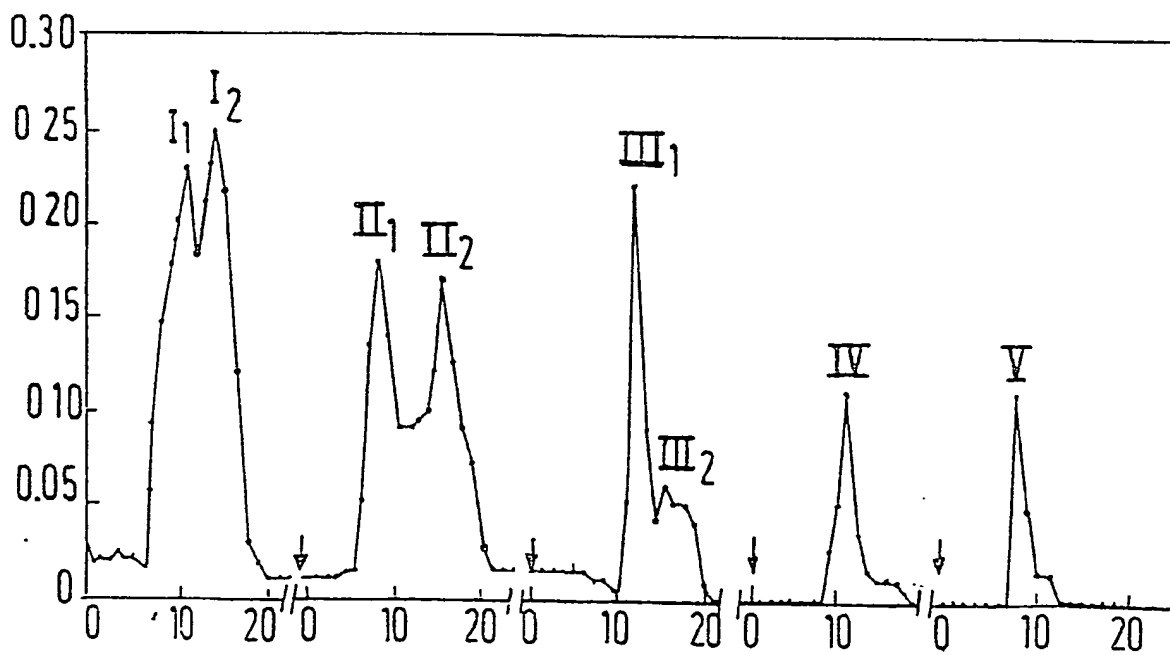


FIG. 2

2/4

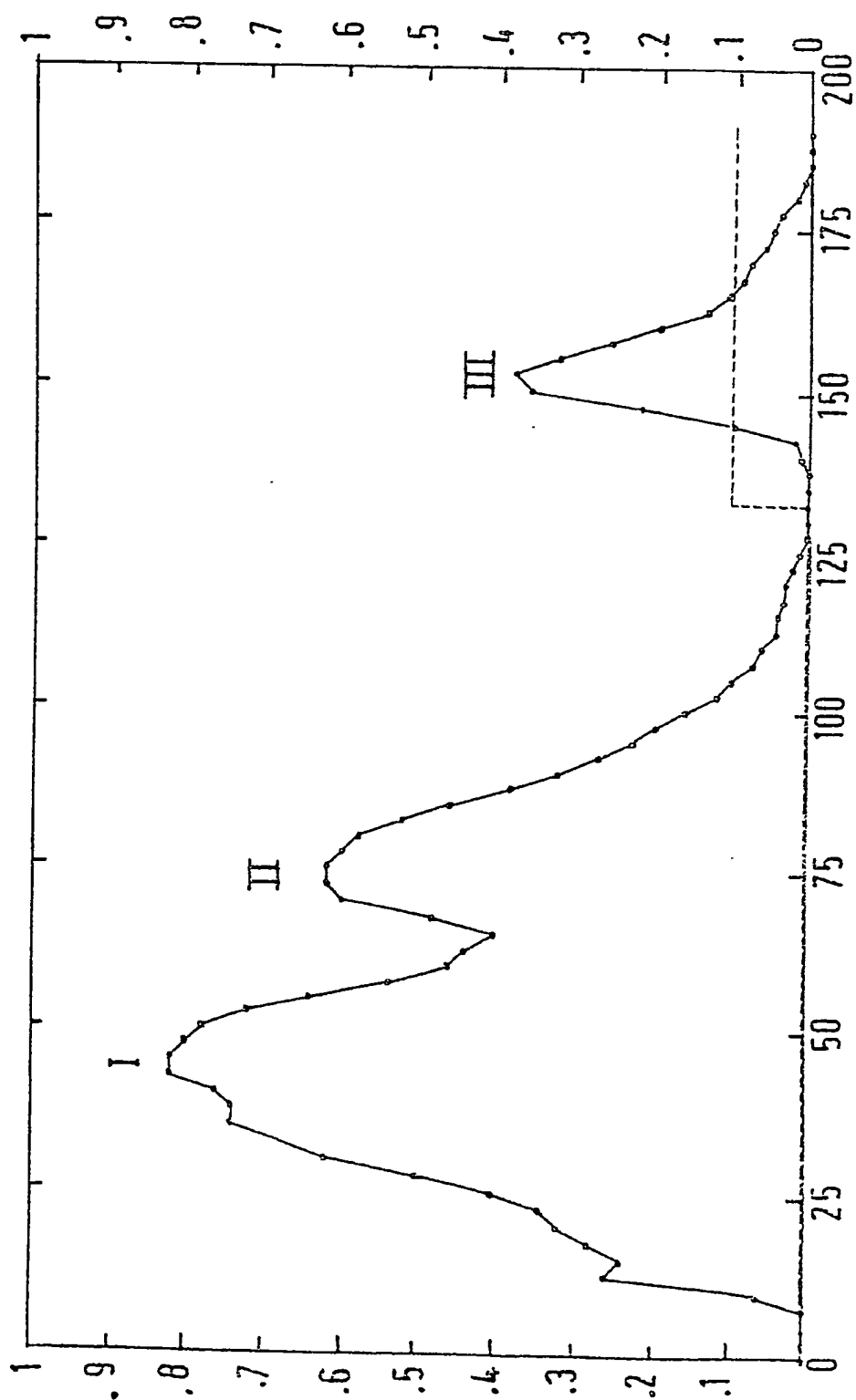


FIG.3



3/4

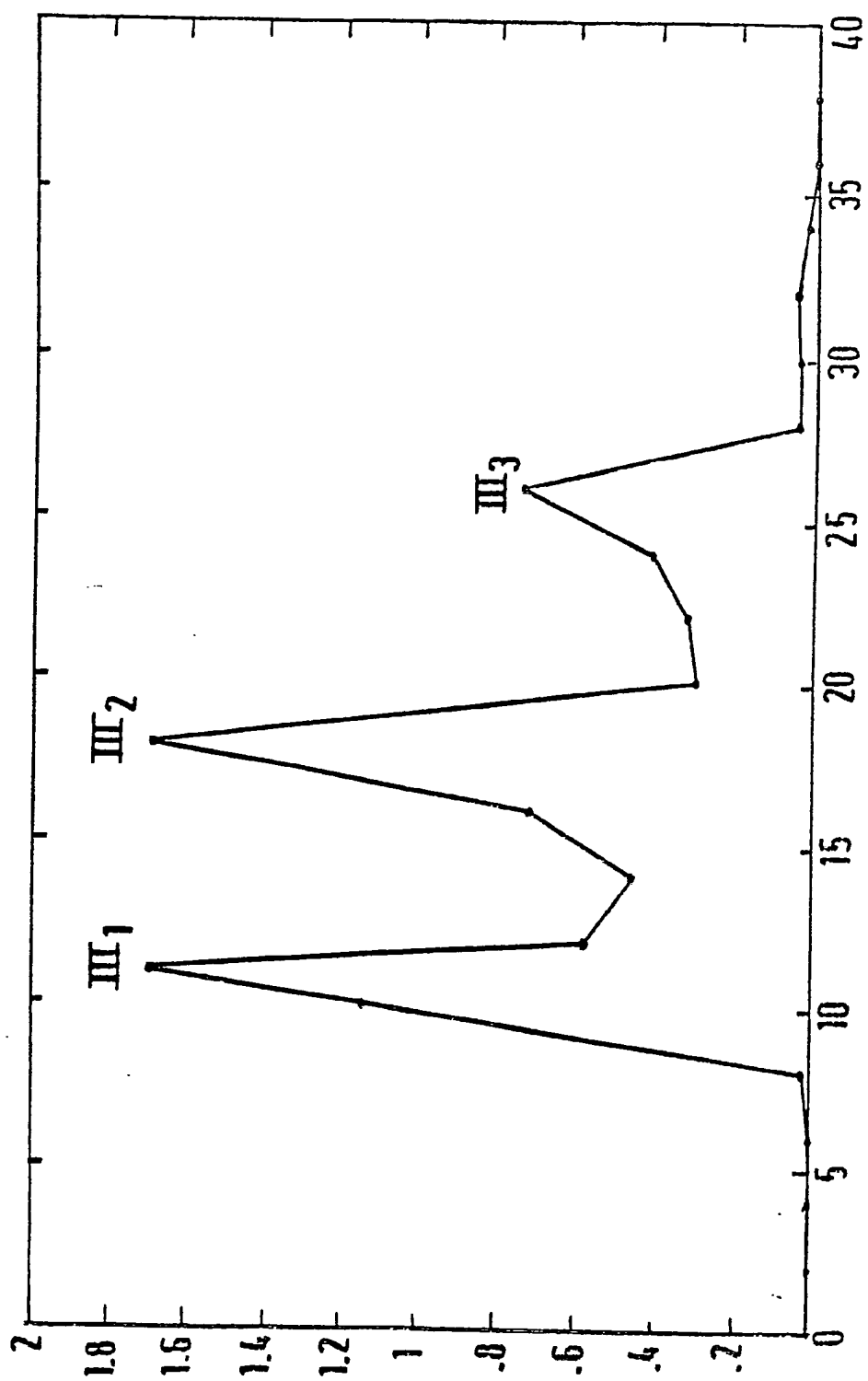


FIG. 4

4/4

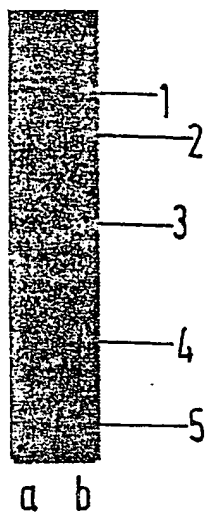


FIG. 5A

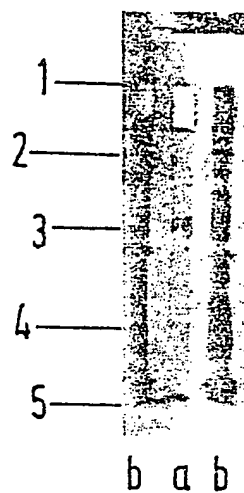


FIG. 5B

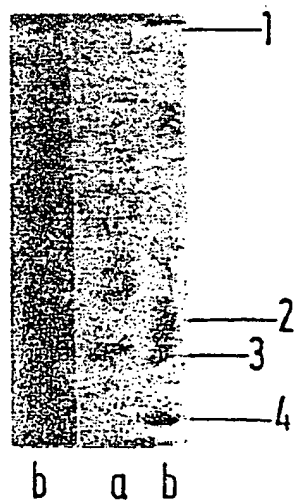


FIG. 6



FIG. 7



Office européen  
des brevets

# RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

0219400

Numero de la demande

EP 86 40 2085

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			Page 2
Categorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl. 4)
A	APPL. MICROBIOL. BIOTECHNOL., vol. 19, no. 1, 1984, pages 67-69; G. YOUNES et al.: "Enhancement of extracellular enzymatic activities produced by immobilized growing cells of Myxococcus xanthus" * Page 67, colonne de gauche, lignes 1-22; page 68, colonne de droite, ligne 17-29; page 68, colonne de gauche, lignes 5-15 *	1-20	
A	---		
A	ARCH. MICROBIOL., vol. 116, no. 1, 1978, pages 51-59, Springer-Verlag; G. GROSSPELIUS: "Myxobacterial slime and proteolytic activity"		
A	---		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl. 4)
A	PHYSIOL. PLANT., vol. 28, no. 3, 1973, pages 523-529; S. STAHL: "Slime of Myxococcus virescens"		
	-----		
Le present rapport de recherche a ete etabli pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 19-12-1986	Examineur CHARLES D. J. P. I. G.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		T theorie ou principe a la base de l'invention E document de brevet anterieur, mais publie a la date de depot ou apres cette date D cite dans la demande L cite pour d'autres raisons & membre de la même famille, document correspondant	
X	particulièrement pertinent a lui seul		
Y	particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même categorie		
A	arrière-plan technologique		
O	divulgation non-écrite		
P	document intercalaire		

0219400 1001 0182



Office européen  
des brevets

# RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

0219400

Numero de la demande

EP 86 40 2085

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Categorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl. 4)
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 102, no. 3, 21 janvier 1985, page 377, résumé 20980x, Columbus, Ohio, US; J-M. NICAUD et al.: "Mutants of Myxococcus protein secretion: an approach to study of a secretory mechanism", & APPL. MICROBIOL. BIOTECHNOL. 1984, 20(5), 344-50 * Résumé *	1-20	A 61 K 37/02 C 12 P 21/00 C 07 K 3/12
A	--- CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 105, no. 5, 4 août 1986, page 188, résumé no. 36763b, Columbus, Ohio, US; A.M. BRETON et al.: "Myxococcus xanthus, a gram negative non pathogenic bacterium, that secretes proteins into the extracellular growth medium, is a potential cloning host for excreted proteins production", & EUR. CONGR. BIOTECHNOL. 3rd 1984, 3, 441-6 * Résumé *	1-20	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl. 4)  A 61 K C 12 P
--- -/-			
Le présent rapport de recherche a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 19-12-1986	Examineur CHARLES D.J.P.I.G.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X	particulièrement pertinent à lui seul	T	théorie ou principe à la base de l'invention
Y	particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie	E	document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date
A	arrière-plan technologique	D	cité dans la demande
O	divulgaration non-écrite	L	cité pour d'autres raisons
D	document intercalaire	&	membre de la même famille, document correspondant